



HAL
open science

Impact de la surexpression de l'ubiquitin-like FAT10 lors de la progression de la NASH sur l'expression et l'activité de PPAR α

Ludivine Clavreul

► To cite this version:

Ludivine Clavreul. Impact de la surexpression de l'ubiquitin-like FAT10 lors de la progression de la NASH sur l'expression et l'activité de PPAR α . Médecine humaine et pathologie. Université de Lille, 2022. Français. NNT : 2022ULILS026 . tel-04318014

HAL Id: tel-04318014

<https://theses.hal.science/tel-04318014>

Submitted on 1 Dec 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
Ecole Doctorale Biologie Santé



THESE

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LILLE

Discipline : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Spécialité : Biochimie, biologie cellulaire et moléculaire, physiologie et nutrition

Impact de la surexpression de l'ubiquitin-like FAT10 lors de la progression de la NASH sur l'expression et l'activité de PPAR α

par

Ludivine CLAVREUL

Soutenue publiquement le 25 Octobre 2022 devant le jury composé de :

Pr Bart STAELS

Président du jury

Dr Catherine POSTIC

Rapportrice

Dr Hervé GUILLOU

Rapporteur

Pr Réjane PAUMELLE-LESTRELIN

Directrice de thèse

**A toi, Ma Sœur,
Eulalie Clavreul**

Remerciements

Tout d'abord, je remercie grandement le Docteur Catherine Postic et le Docteur Hervé Guillou d'avoir accepté de juger mes travaux de thèse. Merci à vous de vous être investis dans la lecture critique de ce projet. Soyez assurés de ma plus grande considération.

Je remercie aussi le Professeur Bart Staels d'avoir accepté que je réalise ma thèse au sein de l'unité U1011 et d'être le président du jury de cette thèse. Le fait d'avoir pu bénéficier de ses conseils, de son regard critique ainsi que de son accompagnement sur mon projet de thèse aura été très précieux.

Je remercie également ma directrice de thèse, le Professeur Réjane Paumelle-Lestrelin, de m'avoir fait confiance pour cette thèse, à moi l'étudiante en Chimie extérieure à Lille. Je la remercie pour son accompagnement, sa disponibilité ainsi que pour les conseils qu'elle a pu me donner lors de ces 4 ans de thèse. Mais surtout je la remercie pour l'humanité dont elle a su faire preuve avec moi comme avec toutes les personnes présentes au laboratoire, pour son soutien sans faille et l'intérêt qu'elle a porté aux différents projets menés lors de ma thèse.

Un grand merci aux collaborateurs d'Anvers, le Professeur Sven Francque, le Professeur Luc Van Gaal et le Docteur An Verrijken pour les échantillons humains présentés dans ce manuscrit. Ce fut toujours un plaisir d'échanger autour des résultats obtenus ensemble.

Je remercie également Robert-Alain Toillon ainsi que Souad Najib qui m'ont aidée à progresser lors des Comités de Suivi Individuels.

La Région Haut de France, l'Institut Pasteur, la Nouvelle Société Francophone d'Athérosclérose et l'Association Française pour l'Étude du Foie sont les principaux organismes qui ont financé mes travaux lors de ma thèse, je les en remercie.

Un énorme merci au Docteur Alexia Cotte qui m'a presque tout appris ! De la formation technique sur les manips d'IF ou de Seahorse jusqu'à la façon de s'organiser ou de construire ma réflexion scientifique. Tu auras été un puits de savoir et un exemple à imiter pour moi ! Ce projet est aussi ton projet et sans toi je n'aurais pas réussi à faire tout ça. Merci de m'avoir formée, tu es une grande (pas en taille, hihi) scientifique.

Je remercie aussi du fond du cœur le Docteur Nathalie Hennuyer qui a été un soutien tellement important pendant toute cette thèse ! Merci de m'avoir transmis toutes ces connaissances que ce soit

en expérimentation animale ou sur les cellules. Merci pour ton aide pendant les manip souris, les heures passées au P2 à faire des injections, et merci d'avoir supporté mon étourderie légendaire !

Merci à ma co-thésarde, le Docteur Lucie Bernard, pour le soutien, les discussions, les cafés, bien nécessaires surtout en cette fin de thèse ! Merci d'avoir été là toujours, dans les bons comme dans les mauvais moments ! On a été dans le même bateau du début à la fin et tu es celle qui m'a le plus comprise pendant ces 4 années. Tu es une personne formidable et je suis fière de te compter comme une amie précieuse avec laquelle je suis sûre que je garderai un lien très fort. Bien sûr, je remercie aussi Clémence Boulet, qui fait partie de ce trio légendaire que nous formons, des vraies Totally Spies ! Merci à toi Clémence pour ton sourire et ta joie de vivre que j'apprécie retrouver à chaque pause et sorties que nous faisons ensemble. Nos debrief Koh Lanta, Top Chef, et Danse avec les Stars sont le rendez-vous immanquable des débuts de semaine ! Tu es une fille en or, ne laisse personne te dire le contraire, et je compte bien ne pas te lâcher de sitôt.

Merci au Docteur Margaux Nawrot et au Docteur Simon Peschard pour votre accueil dans le labo. Grâce à vous, j'ai découvert les incontournables du Nord : la bière, les frites, et bien sûr Bollaert ! Merci pour les sorties dans les bars, les discussions au labo, les conseils et j'en passe. Margaux, ton énergie légendaire nous manque fort à J&K depuis ton départ, vivement que tu reviennes nous voir. Simon, merci également pour ces derniers mois où l'on s'est serré les coudes pour faire face à cette épreuve d'écriture du manuscrit, bientôt le bout du tunnel pour toi aussi !

Je remercie aussi les nouveaux membres de la team FAT10 qui s'agrandit à vue d'œil ! D'abord Sarah et Cyril mais aussi, plus récemment, Sadia. J'espère qu'étudier cette jolie protéine vous tiendra autant à cœur que moi. Merci également à Elena Duran-Gonzales pour son attitude, sa bonne humeur et son sérieux lors de son stage de Master 2 que j'ai eu la chance d'encadrer.

Merci aux JKiens qui ont croisé ma route pendant cette thèse, Dani, Chloé, Arielle, Emilie Nicolas, Hugo, Christina, Mickaël, Cédric et Mélusine avec qui nous avons partagé des discussions endiablées lors des midis ou des sorties en bar. Merci pour tous les anniversaires et les pères Noëls secrets, les soirées jeux et tous les moments du quotidien au labo.

Merci aux autres membres de l'unité pour leur aide et les moments de science partagés pendant ces années de thèse, Audrey, Quentin, Valentine, Doriane, Marie, Aurore, Laurent, Kevin, Pelin, Manue, Emilie Dorchie, Christian, Isabelle, Bruno, Benoît, Yasmine, Alicia, Laura, Hélène, Eloïse, Maheul, Olivier Molendi-Coste, Manju, Manu, Julie, Céline, Marie, Francesco, et Alex. Merci également aux Professeurs Kadiombo Batubungi, Olivier Briand, Sophie Lestavel, Delphine Corseaux, Sandrine Caron-Houde et Anne Tailleux ainsi qu'au Docteur Joel Haas pour leur bienveillance et leurs conseils.

Je remercie Béatrice Duthoit pour le travail si précieux qu'elle réalise au labo et pour sa gentillesse. Merci également à l'équipe administrative d'avoir supporté les questions sur les

commandes, sur les contrats et d'avoir géré les départs en congrès etc, Séverine, Caroline, Marie-Hélène, Marie-Christine, David (2D) et François.

Enfin, merci à toute l'Unité U1011, dans laquelle ce fut un plaisir de faire ma thèse.

Je remercie ma « famille du Nord », la famille Gisquière au sens large, de m'avoir aussi chaleureusement acceptée et avec qui j'ai retrouvé des moments conviviaux quand ma famille me manquait. Merci tout particulièrement à Marina, Marc, Amy, Mélanie et Laurent de m'avoir soutenue depuis plus de 3 ans maintenant.

Merci à tous les nouveaux copains que je me suis fait en venant à Lille de m'avoir soutenu et merci pour les apéros et les repas passés ensemble qui m'ont permis de bien décompresser pendant la thèse. Merci aux copains d'Armentières, Roman, Manon, Rémi, Maëlle et la petite Iris. Je remercie aussi les copains de Chimie Lille. Merci aux voisins Julia et Raph.

On n'oublie pas non plus les copains qui sont plus loin, Julie Develotte, Julie Somhkit, Doro, Aragorn, Antoine, Célia, Léa, Julien, JB, Aurélie, Paupo, Lucas, Elise et tous les Jacks ou Enscmiens, normalement je devrais avoir plus de temps pour venir vous voir maintenant !

Merci à la team Bioaddoct 2018/2019, Clara, Martine, Véro, Erwan et Marie d'avoir fait équipe avec moi dans cette belle aventure qu'est l'associatif.

Je remercie également le Docteur Frédéric de Miollis ainsi que l'équipe du Collège Doctoral, avec un merci plus particulier à Aïcha Araab et Fred Lunginsland, qui m'ont fait confiance et m'ont choisie pour faire partie de cette superbe initiative qu'est Consulid. Mais cette expérience Consulid n'aurait jamais été la même sans la « dream team » que nous avons formé avec le Docteur Marie Leleu et le futur Docteur Marine Dénechaud ! Merci aussi à Anis et Vincent qui reprennent le bébé, et longue vie à Consulid !

Merci à mes copines de thèse qui sont là depuis le début, Norhane et Constance. Surtout un grand merci au Docteur Eva Guilloteau. Merci pour ton soutien sans faille, pour nos discussions quand ça allait mais aussi quand ça n'allait pas. Je réalise à quel point j'ai la chance d'être ton amie, tu es une personne en or, et quelque soit l'endroit où tu iras en post-doc, je te rendrai visite. J'irai où tu iras, comme disais une grande dame.

Ma Morgui, merci d'avoir été là tout au long de cette aventure qu'à été la thèse. Et oui encore une, mais une des plus dures que j'ai dû vivre jusque-là je pense. Merci d'avoir été là, même de loin, dans tous les moments qui ont rythmé ces années, les bons comme les mauvais. Je suis tellement reconnaissante de t'avoir à mes côtés depuis toutes ces années. Maintenant que la thèse se termine, je vais avoir plus de temps, il me tarde de le passer avec toi et avec Quentin dans notre Sud bien aimé.

Ce manuscrit je le dois aussi à ma famille que je remercie du fond du cœur. Merci à mes parents, la Recherche n'est pas vraiment votre domaine mais vous m'avez toujours fait confiance. Même quand je vous ai dit que j'allais à Lille, à l'autre bout de la France, vous m'avez soutenue. Et malgré l'éloignement et les sacrifices, vous avez toujours fait en sorte que tout se passe dans les meilleures conditions pour moi. Pour ça merci, j'espère que ce manuscrit de thèse vous rend fiers, je vous aime très fort.

Je pense aussi fort à mes grands-parents, assise sur leurs genoux, j'étais loin d'imaginer que j'écrirai une thèse un jour. J'espère qu'ils sont fiers de là-haut.

Ma sœur, merci pour tout ! Tu m'as soutenue du début à la fin, supportant mes appels angoissés et les longues minutes à m'écouter râler sur cette fichue thèse. Tu as été mon repère depuis le début et tout au long de mon parcours scolaire. Heureusement que tu as été là, parce qu'il faut le dire, je n'ai pas pris le chemin le plus facile... Et bien voilà c'est fini, et ce manuscrit je te le dédie parce que finalement sans toi je n'aurais jamais pu accomplir tout ça.

Merci à ma coloc de l'amour, ma Bouloche qui a vécu avec moi toutes les étapes de la thèse, du déménagement à Lille jusqu'aux répétitions d'oral dans le canap' à l'appart. A ta façon, tu m'as réconfortée quand tu comprenais que ça n'allait pas et tu as été la présence chaleureuse qui me rassurait quand Lille n'était pas encore « chez moi ». Et maintenant, tu es un vrai « Kô » (à dire avec l'accent Chti) qui à ses quartiers à Mons ou même à Armentières.

Enfin, merci à mon allié du quotidien, à ma moitié, à mon amour, Thibaut. Je te remercie en premier pour la patience dont tu as fait preuve depuis plus de 3 ans maintenant. Et il t'en a fallu de la patience car ça n'a pas été de tout repos de vivre cette thèse à mes côtés. Merci d'avoir été à l'écoute, même quand cela allait à l'encontre de tes convictions. Merci pour ton aide à l'appart et avec Bouloche surtout ces derniers mois. Merci d'avoir été là dans les moments de doutes et d'avoir toujours trouvé les mots pour me rassurer. Avec la thèse c'est une étape qui se termine mais c'est surtout le début de notre vie à deux quand nous aurons notre chez nous. Il me tarde de vivre tout ça avec toi, et plus encore. Je t'aime.

Avec cette thèse, c'est un projet qui se réalise, mon projet à moi mais aussi le projet de toutes ces personnes qui m'ont aidée et épaulée de près ou de loin pendant ces 4 ans. MERCI.

Résumé

Le Peroxysome Proliferator-Activated Receptor α (PPAR α) est un récepteur nucléaire jouant un rôle clé dans la prévention de la stéatohépatite non-alcoolique (NASH) et constitue une cible thérapeutique prometteuse pour le traitement de cette maladie. Cependant, son expression est diminuée dans les foies des patients atteints de NASH. De plus, les agonistes de PPAR α en essais cliniques ne semblent pas être suffisamment efficace pour résoudre la maladie. L'étude des mécanismes de régulation de PPAR α lors de la progression de la NASH est donc cruciale pour mieux définir les stratégies thérapeutiques contre cette atteinte hépatique. Pour cela, dans le cadre de ce projet de thèse, une analyse transcriptomique de foies de patients atteints de NAFLD a été réalisée et les gènes surexprimés lors de la progression de la maladie ont été identifiés. Parmi ces gènes, se retrouve l'Human leukocyte antigen-F Associated Transcript 10 (FAT10 ou UBD) dont l'expression corrèle positivement avec la sévérité de la maladie et négativement avec l'expression de PPAR α dans les foies humains. FAT10 code pour une protéine de la famille des « ubiquitin-like » connue pour être impliquée dans le développement de l'hépatocarcinome. Cependant, son éventuel rôle dans le développement d'autres atteintes hépatiques, telles que la NASH, n'a pas été étudié à ce jour. Ainsi, l'objectif de cette thèse a été de caractériser l'expression de FAT10 in vivo lors de la progression de la NASH et d'étudier l'impact de FAT10 sur l'activité et l'expression de PPAR α dans ce contexte.

Ainsi, la surexpression de Fat10 est retrouvée dans les foies des souris atteintes de NASH suite à différents régimes. L'étude des hépatocytes de ces souris démontre que cette surexpression est spécifique des hépatocytes dans lesquelles l'expression de Fat10 corrèle négativement à celle de Ppar α . Dans les foies des souris et des humains atteints de NASH ainsi que dans les hépatocytes humains surexprimant FAT10 une interaction entre FAT10 et PPAR α est mise en évidence. La diminution de l'expression de FAT10 in vitro favorise l'activité de PPAR α et le métabolisme des lipides. La surexpression de FAT10, au contraire, inhibe l'expression des gènes cibles de PPAR α et réprime le métabolisme des lipides. In vivo, ces résultats sont retrouvés puisque la surexpression de Fat10 dans le foie des souris réprime l'activité transcriptionnelle de Ppar α en réponse à un jeûne et en réponse à un agoniste.

L'ensemble de ces données montre donc que FAT10 est surexprimée dans les hépatocytes lors du développement de la NASH. Cette surexpression est associée à une interaction entre FAT10 et PPAR α et à une inhibition de l'activité de PPAR α en réponse au jeûne et à un traitement par un agoniste. Ces résultats identifient donc FAT10 comme un nouveau régulateur négatif de l'activité de PPAR α dans un contexte de NASH.

Abstract

The Peroxisome Proliferator-Activated Receptor α (PPAR α) is a nuclear receptor playing a key role in the prevention of Non-alcoholic steatohepatitis (NASH). Thus, it is an interesting therapeutic target for the development of treatments against this disease. However, PPAR α expression is decreased in the livers of NASH patients and PPAR α agonists have lacked efficiency in the resolution of the disease. The study of the mechanisms involved in PPAR α regulation during NASH progression is crucial in order to determine better therapeutic strategies against this disease. In the context of this thesis, a transcriptomic analysis of NASH human livers was performed to identify the genes overexpressed during the disease progression. Among these genes, the *Human leukocyte antigen-F Associated Transcript 10* (FAT10 or UBD) was found to correlate positively with NASH severity and negatively with PPAR α expression in human livers. FAT10 encodes for a protein part of the “ubiquitin-like” family which is known to be involved in the development of hepatocarcinoma. However, FAT10’s role in the development of other hepatic diseases, such as NASH, has not been studied yet. Thus, this thesis aims at characterizing Fat10 expression during NASH progression and to study the impact of FAT10 on PPAR α expression and activity in this context.

Fat10 expression was assessed in several murine models of NASH. As FAT10 is known to interact with its targets to regulate their expression and activity, FAT10 interaction with PPAR α was measured by co-immunoprecipitation and Proximity Ligation Assay on human and murine livers *in vivo*, and on human hepatocytes cell lines *in vitro*. The impact of FAT10 modulation on PPAR α activity and expression was determined with human hepatocytes cell lines and a surexpression murine model induced by adenoviral infection.

Fat10 overexpression is observed in the livers of mice during NASH development. The study of hepatocytes isolated from these mice shows that this overexpression is specific of the hepatocytes in which *Fat10* expression correlates negatively with *Ppara* expression. In human and murine livers overexpressing FAT10, an interaction between FAT10 and PPAR α is observed. FAT10 downregulation *in vitro* improves PPAR α activity and lipid metabolism. FAT10 overexpression in hepatocytes cell lines, on the contrary, inhibits PPAR α target genes expression and lipid metabolism. *In vivo*, these results are reproduced since Fat10 overexpression in mice livers represses Ppara activity in response to fasting and agonist treatment.

Altogether, these results demonstrate that FAT10 is overexpressed in hepatocytes during NASH progression. This overexpression leads to an interaction between FAT10 and PPAR α and to the repression of PPAR α activity in response to fasting or agonist treatment. Such data identify FAT10 as a new negative regulator for PPAR α during NASH development.

Sommaire

Liste des abréviations	19
Liste des figures et des tableaux	25
1) Figures	25
2) Tableaux	26
Avant-propos	27
Partie 1 : FAT10, une ubiquitin-like jouant des rôles multiples	29
1) Présentation générale	29
a. Définition	29
b. Structure	30
c. Mécanismes d'action de FAT10	32
i. Interaction covalente	32
ii. Interaction non-covalente	33
d. Expression et régulation de FAT10	34
2) Action sur les partenaires d'interaction	36
a. Description du rôle d'ubiquitin-like	36
i. Dégradation via la voie du 26S protéasome	36
ii. Dégradation via l'autophagie	38
b. Autres modes d'action de FAT10	39
3) Rôles de FAT10	41
a. Rôles physiologiques de FAT10	41
i. Rôle dans l'immunité	41
ii. Rôle de cardioprotection	42
b. Rôles physiopathologiques de FAT10	43
i. Rôle d'oncogène et paradoxe pro-apoptotique	43
ii. Maladies neurodégénératives	44
iii. Désordres métaboliques	45
iv. Rôle dans les stéato-hépatites	46
Partie 2 : Le foie, organe clé du métabolisme énergétique	49
1) Le foie	49
a. Anatomie macroscopique	49
b. Anatomie microscopique	50
i. Le lobule hépatique	50
ii. Le lobule portal	50

iii.	L'acinus hépatique	51
c.	Les cellules hépatiques	51
i.	Les cellules endothéliales	52
ii.	Les cellules stellaires	52
iii.	Les cellules de Küpffer	52
iv.	Les hépatocytes	53
2)	Les fonctions hépatiques	54
a.	Fonction de détoxification	54
i.	Détoxification endogène	54
ii.	Détoxification exogène	55
b.	Fonction exocrine	55
c.	Fonctions métaboliques	56
i.	Métabolisme des acides aminés	56
ii.	Métabolisme du glucose	56
d.	Métabolisme des lipides	56
i.	Métabolisme post-prandial	57
1.	Absorption des lipides	57
2.	Lipogenèse hépatique	57
3.	Synthèse des triglycérides et du cholestérol	58
4.	Stockage et sécrétion des lipides	59
ii.	Métabolisme pré-prandial	61
1.	Hydrolyse des triglycérides	61
2.	Autophagie	61
3.	Oxydation des acides gras	61
iii.	Contrôle transcriptionnel du métabolisme des lipides	63
3)	Altérations des fonctions hépatiques	65
a.	Définition des NAFLD	65
i.	Présentation générale des NAFLD	65
ii.	Stéatose	66
iii.	Inflammation chronique du foie	67
1.	Les facteurs intra-hépatiques	68
2.	Les facteurs extra-hépatiques	68
iv.	Souffrance hépatocellulaire	69
v.	Fibrose	70
b.	Evolution des NAFLD	71
c.	Diagnostic	72

d.	Étiologie de la maladie	74
i.	Facteurs génétiques	74
ii.	Facteurs épigénétiques.....	75
iii.	Facteurs environnementaux.....	76
1.	Alimentation	76
2.	Pollution	77
iv.	Maladie multifactorielle	77
e.	Modèles d'étude de la NASH et des NAFLD.....	79
i.	<i>In vivo</i>	79
1.	Régimes alimentaires et produits chimiques.....	80
2.	Modèles génétiques.....	81
ii.	<i>In vitro</i>	82
f.	Traiter les NAFLD	84
i.	La perte de poids	84
ii.	Les molécules thérapeutiques.....	84
Partie 3 : PPARα, une cible thérapeutique contre la NASH		87
1)	Description générale de PPAR α	87
a.	Définition et localisations de PPAR α	87
b.	Structure de PPAR α	87
c.	Mécanisme d'action de PPAR α	88
i.	Les ligands de PPAR α	88
ii.	Transactivation	89
iii.	Cofacteurs de PPAR α	90
iv.	Transrépression	91
2)	Modulation de l'expression et de l'activité de PPAR α	92
a.	Via le sexe	92
b.	Via le statut nutritionnel	93
c.	Via le rythme circadien.....	94
d.	Via des récepteurs nucléaires.....	94
i.	Récepteur aux glucocorticoïdes (GR)	94
ii.	FXR (Farnesoid X Receptor)	95
iii.	Lui-même	95
e.	Via l'ubiquitinylation	95
f.	Via la phosphorylation.....	96
g.	Via la SUMOylation.....	96
3)	Rôles de PPAR α dans le foie.....	98

a.	Action sur l'inflammation aiguë.....	98
b.	Action sur le métabolisme du glucose/ glycérol.....	99
c.	Action sur métabolisme des lipides	100
i.	Régulation de l'import et de la fixation des lipides	100
ii.	Régulation de la β -oxydation mitochondriale	100
iii.	Régulation de la β -oxydation péroxysomale	100
iv.	Régulation de l' ω -oxydation microsomale	101
v.	Régulation de la lipogenèse hépatique	101
vi.	Régulation des gouttelettes lipidiques.....	101
vii.	Régulation des lipoprotéines.....	102
viii.	Hépatokines	102
ix.	PPAR α dans les hépatocytes.....	103
4)	PPAR α dans les NAFLD	104
a.	PPAR α joue un rôle protecteur pour le foie	104
i.	PPAR α et la stéatose.....	104
ii.	PPAR α et l'inflammation	105
iii.	PPAR α et la fibrose	105
b.	PPAR α , une cible thérapeutique.....	106
i.	Agonistes sélectifs.....	107
1.	Chez l'animal	107
2.	Chez l'humain.....	109
ii.	Dual-agonistes.....	109
1.	Chez l'animal	110
2.	Chez l'humain.....	110
iii.	Pan-agoniste	111
1.	Chez l'animal	111
2.	Chez l'humain.....	112
c.	Régulation de PPAR α lors de la progression des NAFLD	112
i.	Expression dans les modèles précliniques de NAFLD	113
ii.	Expression chez l'humain.....	113
d.	Mécanismes modulant PPAR α lors du développement des NAFLD	113
	Partie 4 : Travaux	117
1)	Objectifs	117
2)	Matériel et méthodes.....	118
a.	Tableau des ressources.....	118
c.	Modèles animaux	121

i.	But de l'étude : Caractérisation de l'expression de Fat10 dans un modèle de NASH induite par un régime <i>in vivo</i>	121
ii.	But de l'étude : Caractérisation de la surexpression de Fat10 dans les hépatocytes primaires murins et la fraction non-parenchymateuse.....	122
iii.	But de l'étude : Exploration de l'impact de la surexpression hépatique de Fat10 sur l'expression et l'activité de Ppar α en réponse au jeûne ou à un traitement au pémafibrate <i>in vivo</i>	123
iv.	Histologie	123
1.	Fixation, inclusion et coupe de foie.....	123
2.	Marquage hématoxyline et éosine (H&E).....	124
3.	Établissement des scores histologiques.....	124
v.	Dosages biochimiques	125
1.	Dosage de lipides hépatiques.....	125
2.	Dosage biochimique des paramètres circulants.....	126
d.	Analyse transcriptomique	126
i.	Puces à ADN (Affymetrix).....	126
ii.	Analyse bioinformatique des données	127
e.	Lignées cellulaires	127
i.	Culture cellulaire.....	127
ii.	Surexpression de FAT10	127
1.	Endogène.....	127
2.	Exogène	127
iii.	Inhibition de l'expression de FAT10 et de PPAR α	128
iv.	Activation de PPAR α par déprivation du milieu de culture et/ ou traitement au pémafibrate	128
v.	Tests fonctionnels.....	129
1.	BODIPY	129
2.	Seahorse.....	129
f.	Extraction et quantification de l'ARNm par RT qPCR.....	130
g.	Extraction et quantification des protéines par western blot et co-immunoprécipitation 131	
i.	Western Blot	131
ii.	Co-immunoprécipitation (Co-IP)	132
h.	Immunomarquages.....	133
i.	Immunofluorescence (IF).....	133
ii.	Tyramide	133
iii.	Proximity Ligation Assay (PLA)	134

i.	Analyses statistiques	135
3)	Résultats.....	137
a.	FAT10 est surexprimée dans le foie lors de la progression de la NASH et corrèle négativement avec <i>PPARα</i>	137
i.	L'expression de FAT10 est augmentée dans les foies des patients atteints de NASH	137
ii.	L'expression de <i>FAT10</i> corrèle positivement avec la sévérité de la maladie et avec l'inflammation.....	138
iii.	L'expression de <i>FAT10</i> corrèle négativement avec l'expression de <i>PPARα</i> et celle de ses gènes cibles	140
b.	Fat10 est surexprimée dans les hépatocytes de souris développant une NASH et corrèle négativement avec l'expression de <i>Ppara</i>	141
i.	Établissement d'un modèle pré-clinique de NASH.....	141
ii.	Fat10 est surexprimée dans les hépatocytes au cours du développement de la NASH	145
iii.	L'expression de <i>Fat10</i> corrèle négativement à celle de <i>Ppara</i> dans les hépatocytes murins lors du développement de la NASH.....	149
c.	FAT10 interagit avec <i>PPARα</i> dans les hépatocytes.....	150
i.	<i>In vivo</i>	150
ii.	<i>In vitro</i>	151
iii.	L'inhibition des voies de dégradation stabilise les complexes FAT10/ <i>PPARα</i> sans moduler l'expression protéique de <i>PPARα</i>	154
d.	FAT10 régule négativement le métabolisme des lipides en inhibant l'activité transcriptionnelle de <i>PPARα in vitro</i>	160
i.	Diminuer l'expression de <i>FAT10</i> favorise l'activité de <i>PPARα</i> et le métabolisme des lipides associé.....	160
ii.	Surexprimer FAT10 réprime l'activité de <i>PPARα</i> et le métabolisme des lipides associé.	163
e.	La surexpression de <i>Fat10 in vivo</i> inhibe l'activité de <i>Ppara</i> en réponse au jeûne.....	165
i.	Établissement d'un modèle <i>in vivo</i> de surexpression de <i>Fat10</i>	165
ii.	La surexpression de <i>Fat10</i> induit une interaction de <i>Fat10</i> avec <i>Ppara</i> et inhibe l'activité de <i>Ppara</i> en réponse à un jeûne long	169
f.	FAT10 altère la réponse de <i>PPARα</i> à l'agoniste.....	172
i.	La diminution de l'expression de <i>FAT10</i> améliore la réponse de <i>PPARα</i> à son agoniste <i>in vitro</i>	172
ii.	La surexpression de <i>Fat10</i> bloque la réponse de <i>Ppara</i> à son agoniste <i>in vivo</i>	174
	Partie 5 : Discussion	177
1)	L'expression de FAT10 est augmentée spécifiquement dans les hépatocytes lors du développement de la NASH	177
2)	Étude de la régulation de <i>PPARα</i> dans le contexte pathologique de la NASH.....	179
3)	Mode d'action de FAT10 sur la régulation de l'activité de <i>PPARα</i>	180
4)	Impact de la régulation de l'activité de <i>PPARα</i> par FAT10 sur le métabolisme des lipides.	182

5) Limitations du modèle CDAA dans l'étude de l'impact de FAT10 sur l'activité de PPAR α ..	184
6) Effets bénéfiques de l'inhibition de l'expression de FAT10 sur le métabolisme des lipides et la prévention de la NASH.....	185
Conclusion générale de la thèse	189
Bibliographie	191
Annexes	20909

Liste des abréviations

AAV : Adeno-associated virus	B : Ballooning
ABC : ATP-binding cassette	BAF : Bafilomycin A1
ABCD : Acyl-CoA ABC transporter D	BCL2 : B cell lymphoma 2
ACC : Acetyl-CoA carboxylase	BEM1 : Bud emergence 1
ACLY : ATP-citrate lyase	BMAL-1 : Brain and muscle aryl hydrocarbon receptor-like protein 1
ACOX : Acyl-CoA oxidase	BSA : Albumine sérique bovine
ACS : Acyl-CoA synthase	C/EBP β : CCAAT/ enhancer-binding protein beta
ACSL : Acyl-CoA synthetase long-chain family member	cAMP : AMP cyclique
ADN : Acide desoxyribonucléique	CARD : Caspase activation and recruitment domain
ADNc : AND complémentaire	Cav3 : Caveolin 3
ADNssc : ADN complémentaire simple brin	CBP : CREB binding protein
AGE : Advanced glycation end product	CCL : Chemokine ligand
AGPAT : Acylglycerol-3-phosphate	CCT : CTP-phosphocholine citydyltransferase
AKT/ PKB : Protein kinase B	CD : Chow diet
ALAT : Alanine aminotransférase	CD36 : Cluster of differentiation 36
Alms1 : Alstrom syndrome 1	CDA A : Choline-deficient L-amino acid-defined
AMLN : Amylin	CDK7 : Cyclin-dependant kinase 7
AMP : Adenosine monophosphate	CETP : Cholesterol ester transfer protein
AMPK : AMP-activated protein kinase	ChREBP : Carbohydrate responsive element binding protein
AP-1 : Activator protein 1	CLOCK : Circadian locomotor output cycles protein kaput
APOA : Apolipoprotein A	CMA : Chaperone-mediated autophagy
APOC3 : Apolipoprotein C3	CMC : Carboxyméthylcellulose
ARN : Acide ribonucléique	Co-IP : Co-immunoprécipitation
ARNc : ARN complémentaire	CPT1 : Carnitine palmitoyl transferase 1
ARNm : ARN messenger	CSAA : Choline-supplemented L-amino acid-defined
ASAT : Aspartate aminotransférase	CVD : cardiovascular diseases
ASH : Alcoholic steatohepatitis	
ASK1 : Apoptosis signal-regulating kinase 1	
ATG : Autophagy-related protein	
ATGL : Adipose TG lipase	
ATP : Adenosine triphosphate	

DAG : Diacylglycérol
 DBD : DNA binding domain
 DDC : 3,5-diethoxycarbonyl-1,4-dihydrocollidine
 Deptor : DEP domain-containing mTOR-interacting protein
 DGAT : DAG acyltransférase
 DMSO : Diméthylsulfoxyde
 DT2 : Diabète de type 2
 EDTA : Éthylène diamine tétraacétique
 eEF1A1 : Eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1
 EGTA : Ethylen glycol-bis(beta-aminoéthyl éther)-N,N,N',N'-tetraacetic acid
 EHHADH : Enoyl-CoA hydratase and 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase
 ESC2 : Establishment silent chromatin 2
 FABP : Fatty acid binding protein
 FADH₂ : Dihydroflavine-adenine dinucleotide
 FADS : Fatty acid desaturase
 FASN : Fatty acid synthase
 FAT : Fatty acid translocase
 FAT10 : Human leucocyte antigen-F associated transcript 10
 FATP : Fatty acid transport protein
 FC : Fold change
 FDR : False discovery rate
 FFA : Free fatty acid
 FGF21 : Fibroblast growth factor 21
 FLIP : Fatty liver inhibition of progression
 FLS : Fatty liver Shionogi
 FSP27 : Fat specific protein 27
 FUBI : FAU ubiquitin
 FXR : Farnesoid X receptor
 G3P : Glycerol-3-phosphate
 GAN : Gubra amylin NASH
 GC : Glucocorticoïdes
 GCKR : Glucokinase regulatory protein
 GFP : Green fluorescent protein
 GG : diglycine
 GLP1 : Glucagon-like peptide 1
 Glut : Glucose transporter
 GPAT : G3P acyltransferase
 GPDH : G3P dehydrogenase
 GR : GC receptor
 GRIP1 : Glutamate receptor interacting protein 1
 GRP78 : 78kDa Glucose regulated protein
 GS : Glycogen synthase
 GSK3 : Glycogen synthase kinase 3
 GSKβ : Glycogen synthase kinase beta
 GTPase : Guanosine triphosphatase
 Gys-2 : Glycogen synthase 2
 H&E : Hématoxyline et éosine
 HAT : histone acetyltransferase
 HBSS : Hank's balanced salt solution
 HCC : Hepatocellular carcinoma
 HDAC : Histone deacetylase
 HDAC : Histone deacetylase
 HDL : High density lipoprotein
 HEPES : Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique
 HFSC : High fat supplémenté en sucrose et cholestérol
 Hg : Haptoglobine
 HL : Hepatic lipase
 HMGCR : 3-hydroxy-3-méthylglutaryl coenzyme A reductase
 HMGCS2 : Hydroxyméthylglutaryl-CoA synthase 2

HNF4 : Hepatocyte nuclear factor 4
 HP : Hépatocytes primaires
 HRP : Horseradish peroxidase
 HSD17B13 : 17-beta hydroxysteroid dehydrogenase 13
 HSL : Hormone sensitive lipase
 HUB1 : Histone mono-ubiquitination 1
 HUVEC : Human umbilical vein endothelial cells
 IFN : Interféron
 HUWE1 : HECT UBA and VWE domain containing protein 1
 I : Inflammation
 IDL : Intermediate density lipoprotein
 IF : Immunofluorescence
 IL : Interleukine
 IL1-ra : Interleukin receptor antagonist
 IMC : Indice de masse corporelle
 IR : Insulino-résistance
 IRGM : Immunity-related GTPase family M protein
 ISG15 : Interferon-stimulated gene 15
 ISRE : Interferon sequence responsive element
 ikK : I kappa kinase
 JAK2 : Janus kinase 2
 JNK : c-Jun-N-terminal kinase
 K8/18 : cytokératine 8/18
 LBD : Ligand binding domain
 LC3 : 1A/1B light chain 3
 LCAD : Long-chain acyl-CoA dehydrogenase
 LCAT : Lecithin-cholesterol acyl-transferase
 LCMV : Lymphocytic choriomeningitis virus
 LDL : Low density lipoproteins
 LIPE : Lipase E
 LMP : Latent membrane protein 2
 L-PCA1 :
 LPIN : Lipin
 LPL : Lipoprotein lipase
 LPL : Lipoprotein lipase
 LPS : Lipopolysaccharide
 LXR : Liver X receptor
 MAD2 : Mitotic arrest deficient 2
 MAFLD : Metabolic-associated fatty liver disease
 MAPK : Mitogen-activated protein kinase
 MBOAT7 : Membrane Bound O-acyltransferase domain containing 7
 MCAD : Medium-chain acyl-CoA dehydrogenase
 MCD : Methionine and choline deficient
 MDB : Mallory-Denk bodies
 MDM2 : Mouse double minute 2
 MECL-1 : Multicatalytic endopeptidase complex-like 1
 Med/TRAP/DRIP : Mediator/ thyroid hormone receptor-associated protein/ vitamin D receptor interacting protein
 MEM : Minimum essential medium
 MFN2 : Mitofusin 2
 MGL : Monoglycérine lipase
 MHC : Major histocompatibility complex
 miRNA : microARN
 mTEC : Medullary thymic epithelial cells
 mTOR : Mechanistic target of rapamycin
 mTORC1 : mTOR complex 1
 MTP : Microsomal TG transfer protein
 MTTP : Microsomal TG transfer protein
 NAE : NEDD8-activating enzyme
 NAFL : Non-alcoholic fatty liver
 NAFLD : Non-alcoholic fatty liver disease

NADPH : Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
 NAS : NASH-activity score
 NASH : Non-alcoholic steatohepatitis
 NCOR1 : Nuclear receptor corepressor 1
 NEAA : MEM Non-essential amino-acids
 NEDD : Neural precursor cell expressed developmentally downregulated protein
 NEFA : Non-esterified fatty acid
 NF- κ B : Nuclear factor kappa B
 NK : Natural killer
 NKT : Natural killer T cells
 NLRP3 : NOD-like receptor family pyrin domain containing 3
 NPC : Cellules non-parenchymateuses
 NPC1L1 : Niemann-Pick C1-like 1
 NUB1L : NEDD8 ultimate buster-1 long
 OCR : Oxygen consumption rate
 OMS : Organisation mondiale de la santé
 OTUB1 : OUT deubiquitinase
 PA : Acide phosphatidique
 PAF : Paraformaldéhyde
 PAP/ Lipin : Phosphatidate phosphohydrolase
 PAQR : Progestin and adipoQ receptor
 PBS : Phosphate buffered saline
 PC : Phosphatidylcholine
 PCLS : Precision-cut liver slices
 PCNA : Proliferating cell nuclear antigen
 PDGF α : Platelet derived growth factor alpha
 PDH : Pyruvate dehydrogenase
 PDK4 : Pyruvate dehydrogenase kinase 4
 PE : Phosphatidyléthanolamine
 PGC1 : PPAR-gamma coactivator 1
 PI3K : Phosphatidylinositol 3-kinase
 PKA : Protein kinase A
 PKC : Protein kinase C
 PLA : Proximity ligation assay
 PLIN : Perilipine
 PLPT : Phospholipid transfer protein
 PML : Promyelocytic leukemia
 PMSF : Fluorure de phénylméthyl sulfonyle
 PNPLA : Patatin-like phospholipid domain containing protein
 PPAR : Peroxisome proliferator-activated receptor
 PPP1R3B : Protein phosphatase 1 regulatory subunit 3B
 PPRE : PPAR response element
 PRAS40 : Prolin-rich akt substrate of 40kDa
 PRIC : PPAR alpha interacting complexes
 PRR : Pattern recognition receptor
 P-val : p-value
 qPCR : Quantitative polymerase chain reaction
 QSP : Quantité suffisante pour
 Rab7 : Ras-related protein 7
 ACAD : FAD-dependant Acyl-CoA dehydrogenase
 Raptor : Regulatory-associated protein of mTOR
 RE : Réticulum endoplasmique
 REV-ERB : Reverse gene of thyroid receptor
 RHD : Règles hygiéno-diététiques
 RIG-1 : Retinoic acid inducible gene 1
 RIP140 : Receptor interacting protein 140
 ROS : Reactive oxygen species
 RT : Rétro-transcription
 RXR : Retinoic X receptor
 S : Stéatose
 Saa : Serum amyloid A
 SAE : SUMO-activating enzyme

SAF : Steatosis activity and fibrosis

SCAD : Small-chain acyl-CoA dehydrogenase

SCD : Stearoyl-CoA desaturase

SD : Déviation standard

SDS : Sodium dodécyl sulfate

SEM : Standard error of mean

SFA : Saturated fatty acid

SGLT2 : Sodium-glucose cotransporter-2

shARN : Short hairpin RNA

Shh : Sonic hedgehog

siARN : Small interfering RNA

SIRT : Sirtuin

SLC27A : Solute carrier 27A

SMRT : Silencing mediator of retinoid and thyroid receptors

SPPARM : Selective PPAR modulators

SQSTM1 : Sequestosome 1

SRC : steroid receptor coactivator

SREBP : Sterol regulatory element binding protein

STAT : Signal transducer and activator transcription

SUMO : Small ubiquitin-like modifier

SVF : Sérum de veau foetal

SWI/SNF : switch/ sucrose non-fermenting

TBK1 : TANK-binding kinase

TBL1 : Transducin beta-like protein 1

TBL1R : TBL-related 1

TCA : Tricarboxylic acid cycle

TG : Triglycérides

TGFβ : TTransforming growth factor beta

TGR5 : Takeda G protein-coupled receptor 5

THRβ : Thyroid hormone receptor beta

TIF : Transcriptional mediators intermediary factor 2

TLR : Toll-like receptor

TM6SF2 : Transmembrane 6 superfamily 2 human gene

TNF : Tumor necrosis factor

TSOD : Tsumura Suzuki obese diabetes

UBA : Ubiquitin-associated

UBA6 : Ubiquitin-like modifier activating enzyme 6

UBC12 : Ubiquitin-conjugating enzyme E2M

UBD : Ubiquitin D

UBE1 : Ubiquitin-activating enzyme 1

UBE2Z : E2 ubiquitin-conjugating enzyme Z

UFM : Ubiquitin-fold modifier

URM : Ubiquitin-related modifier

USE1 : UBA6-specific E2 conjugating enzyme 1

VCP : Valosing-containing protein

VLCAD : Very long-chain acyl-CoA dehydrogenase

VLDL : Very low density lipoprotein

VNN1 : Vanin-1

VWA : Von Willebrand A

WT : Wild type

YAP1 : Yes-associated protein 1

ZEB2 : Zinc-finger E-box binding homebox 2

αHNF4RE : HNF4 response element

β-OH : beta-hydroxybutyrate

Liste des figures et des tableaux

1) Figures

Figure 1 : Structure de la protéine FAT10 et représentation schématique (adaptée de Aichem <i>et al.</i> , 2018).	29
Figure 2 : Structure du 26S protéasome (adaptée d'Aichem and Groettrup, 2020).	30
Figure 3 : Interaction de FAT10 avec le 26S protéasome (adaptée d'Aichem and Groettrup, 2020).	32
Figure 4 : Régulation de FAT10 (adaptée d'Aichem and Groettrup, 2016).	36
Figure 5 : Dégradation des substrats FATylés par le protéasome 26S (adaptée de Rani <i>et al.</i> , 2012).	38
Figure 6 : Dégradation des substrats FATylés par la voie de l'autophagie (adaptée de Basler <i>et al.</i> , 2015).	39
Figure 7 : Cibles de FAT10 caractérisées à ce jour (adaptée d'Aichem A <i>et al.</i> , 2020).	41
Figure 8 : Rôles physiologiques et physiopathologiques de FAT10.	47
Figure 9 : Anatomie et vascularisation du foie (Encyclopædia Britannica https://www.britannica.com/science/human-digestive-system/Gross-anatomy#/media/1/1081754/68633).	50
Figure 10 : Anatomie microscopique du foie (adaptée d'Amboss ; https://www.amboss.com/us/knowledge/Liver).	51
Figure 11 : Organisation cellulaire d'une sinusoïde hépatique (Amboss ; https://www.amboss.com/us/knowledge/Liver).	54
Figure 12 : β -oxydation des acides gras (adaptée de Fransen <i>et al.</i> , Mol Sci, 2017).	63
Figure 13 : Métabolisme des lipides dans le foie.	65
Figure 14 : Prévalence des NAFLD dans le monde (adaptée de Younossi <i>et al.</i> , 2019).	66
Figure 15 : Progression des NAFLD (adaptée de Haas and Staels, 2016)	74
Figure 16 : Principaux mécanismes moléculaires conduisant au développement de la NASH (Friedman <i>et al.</i> , 2018).	79
Figure 17 : Structure schématique de PPAR α (Bougarne <i>et al.</i> , 2018).	88
Figure 18 : Mécanisme d'action de PPAR α (adapté de Bougarne <i>et al.</i> , 2018).	92
Figure 19 : Principales voies de régulation de PPAR α dans le foie (Pawlak <i>et al.</i> , 2015).	97
Figure 20 : Rôle hépatoprotecteur de PPAR α lors du développement de la NASH (Pawlak <i>et al.</i> , 2015).	106
Figure 21 : Effets des agonistes de PPAR α sur les mécanismes à l'origine du développement de la NASH (adaptée de Cariello <i>et al.</i> , 2021).	112
Figure 22 : L'expression de FAT10 est augmentée dans les foies des patients atteints de NASH. ..	138
Figure 23 : L'expression de FAT10 corrèle positivement avec la sévérité de la maladie et l'inflammation.	139
Figure 24 : L'expression de FAT10 diminue lors de la résolution de la NASH suite à une perte de poids.	140
Figure 25 : L'expression de FAT10 corrèle négativement avec l'expression de PPAR α et de certains de ses gènes cibles.	141
Figure 26 : Le régime CDAA induit le développement de la NASH dès 2 semaines d'exposition. .	144
Figure 27 : Fat10 est surexprimée dans les hépatocytes des souris atteintes de NASH.	146
Figure 28 : L'expression de Fat10 corrèle positivement avec l'expression de gènes pro- inflammatoires dans les foies de souris atteintes de NASH.	148

Figure 29 : L'expression de Fat10 corrèle négativement avec l'expression de Ppar α et de certains de ses gènes cibles.....	150
Figure 30 : FAT10 interagit avec PPAR α in vivo dans les foies humains et murins lors de la progression de la NASH.....	151
Figure 31 : FAT10 est surexprimé in vitro dans des lignées d'hépatocytes humains traités avec des cytokines pro-inflammatoires.....	152
Figure 32 : FAT10 interagit avec PPAR α in vitro dans les hépatocytes traités avec des cytokines pro-inflammatoires.....	154
Figure 33 : L'inhibition du protéasome induit l'accumulation des interactions FAT10/PPAR α dans les hépatocytes.....	155
Figure 34 : L'inhibition du protéasome favorise l'interaction entre FAT10 et HDAC6 dans les hépatocytes.....	156
Figure 35 : L'inhibition des voies de dégradation module le nombre d'interaction FAT10/PPAR α dans les hépatocytes surexprimant stablement FAT10.....	159
Figure 36 : La diminution de l'expression de FAT10 in vitro favorise l'activité transcriptionnelle de PPAR α dans les hépatocytes.....	162
Figure 37 : La surexpression de FAT10 in vitro réprime l'activité transcriptionnelle de PPAR α dans les hépatocytes.....	164
Figure 38 : Fat10 est surexprimée dans les foies des souris infectées avec l'Ad-FAT10.....	165
Figure 39 : La surexpression hépatique de Fat10 induit une modification du phénotype des souris.....	168
Figure 40 : Fat10 est faiblement exprimé dans les autres organes que le foie par l'infection avec l'Ad-FAT10.....	169
Figure 41 : La surexpression de FAT10 in vivo réprime l'activité transcriptionnelle de Ppar α en réponse au jeûne et conduit à une interaction entre Fat10 et Ppar α	172
Figure 42 : La modulation de FAT10 in vitro régule l'activité transcriptionnelle de Ppar α en réponse au pémafibrate.....	173
Figure 43 : La surexpression de FAT10 in vivo réprime l'activité transcriptionnelle de Ppar α en réponse au pémafibrate.....	175
Figure 44 : Schéma-Bilan.....	190

2) Tableaux

Tableau 1 : Principales cibles thérapeutiques en essais cliniques de phase 3 pour le traitement de la NASH (adaptée de Lucie Bernard, Thèse de Doctorat en Pharmacie, Lille, 2022).....	86
Tableau 2 : Principaux gènes cibles de PPAR α (adapté de Rakhshandehroo <i>et al.</i> , 2010).....	104
Tableau 3 : Effets des agonistes PPAR α sur les paramètres de la NASH chez l'humain et chez la souris (adaptée de Lucie Bernard, Thèse de Doctorat en Pharmacie, Lille, 2022).....	107
Tableau 4 : Tableau des ressources utilisées lors de la thèse.....	120
Tableau 5 : Détermination des scores histologique lors du diagnostic de NASH (d'après Puri and Sanyal, 2012).....	125
Tableau 6 : Séquences cibles des siARN utilisés lors de la thèse.....	128
Tableau 7 : Séquences et références des amorces utilisées lors de la thèse.....	131
Tableau 8 : Références et dilutions des anticorps primaires et secondaires utilisés lors de la thèse.....	135

Avant-propos

Les NAFLD sont un problème de santé publique grandissant pour les sociétés actuelles. Cette manifestation hépatique du syndrome métabolique est un spectre de pathologies complexe et constitue un facteur de risque majeur dans le développement d'autres maladies métaboliques, telles que les maladies cardiovasculaires ou le diabète de type 2. Les NAFLD se caractérisent par une accumulation chronique de lipides dans le foie qui donne lieu à une inflammation que l'on qualifie de stéatohépatite non-alcoolique (NASH). Une fibrose peut alors se développer dans le tissu hépatique jusqu'à atteindre le stade de cirrhose. Dans le cadre de l'étude des mécanismes impliqués dans le développement des NAFLD, le récepteur nucléaire PPAR α a été identifié en tant que cible thérapeutique potentielle. En effet, l'activation de PPAR α par ses agonistes est hépatoprotectrice puisque le récepteur nucléaire induit la transcription de gènes clés du métabolisme des lipides. De plus, PPAR α inhibe des facteurs importants des voies de signalisation de l'inflammation et prévient la fibrogenèse. Malheureusement, l'expression génique de PPAR α est diminuée avec la progression de la NASH.

Ainsi, dans l'équipe, l'étude transcriptomique d'une cohorte de patients obèses atteints de NAFLD a été réalisée dans le but d'identifier des gènes associés à cette diminution de l'expression de PPAR α lors de la progression de la maladie. Ainsi, une corrélation négative entre l'expression de PPAR α et celle de FAT10 a été observée. Le projet de thèse s'est donc articulé autour de la compréhension de l'implication de la protéine codée par FAT10 dans la régulation de l'expression et de l'activité de PPAR α lors de la progression de la NASH.

Ce manuscrit de thèse retrace donc la progression de ce projet et débute par l'**introduction** composée de 3 parties. La 1^{ère} partie présente la protéine « ubiquitin-like » FAT10, impliquée dans de nombreux mécanismes physiopathologiques. FAT10 est surexprimée par des stimuli pro-inflammatoires dans les différents tissus de l'organisme, notamment dans le foie. Cependant, son rôle dans les atteintes hépatiques associées au métabolisme, telles que la NASH, est méconnu. La 2^{nde} partie décrit l'organe touché par ces pathologies qu'est le foie, son rôle clé dans le métabolisme des lipides ainsi que les déséquilibres à l'origine du développement des NAFLD. Enfin, la 3^{ème} partie se concentre sur la cible thérapeutique de choix qu'est PPAR α pour le traitement des NAFLD. Son rôle dans le métabolisme des lipides ainsi que les effets de son activation sur les NAFLD sont détaillés dans cette partie.

Le cœur de ce manuscrit présente les **travaux** originaux répondant à la question de l'impact de FAT10 sur la régulation de l'expression et de l'activité de PPAR α lors de la progression de la NASH. La caractérisation de l'expression de FAT10 dans ce contexte pathologique ainsi que l'impact de sa modulation sur l'expression et l'activité de PPAR α γ sont explorés à l'aide de plusieurs modèles humains et murins *in vivo* et *in vitro*.

Les résultats ainsi présentés font l'objet d'une **discussion scientifique** et ont été valorisés dans le cadre d'un **article scientifique** soumis pour publication et lors de communications orales dans différents congrès nationaux et internationaux. La discussion et les annexes comprenant une version de l'article ainsi que la liste des communications orales se retrouvent à la fin du manuscrit.

Finalement, les résultats obtenus lors de ce projet de thèse ont permis d'identifier FAT10 comme un nouveau régulateur négatif de l'activité de PPAR α lors du développement de la NASH. Cette découverte ouvre la voie pour une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans la progression de la maladie et le développement de meilleures stratégies thérapeutiques.

Partie 1 : FAT10, une ubiquitin-like jouant des rôles multiples

1) Présentation générale

a. Définition

L'étude de la région codant le complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (MHC class I) a permis d'identifier des gènes appartenant à différentes classes structurales. Parmi ces gènes se retrouve le *Human leucocytes antigen (HLA)-F adjacent transcript 10 (FAT10)* ou *ubiquitin D (UBD)* (W. Fan *et al.*, 1996). Initialement, ce gène a été identifié comme étant exprimé dans les cellules B et code pour une protéine ayant une structure de di-ubiquitine (Gruen *et al.*, 1996).

De par sa structure (**Fig. 1**), analogue à l'ubiquitine, FAT10 fait partie de la famille des « **ubiquitin-like** ». Cette famille regroupe des protéines qui partagent une structure et une évolution proche de celles de l'ubiquitine. Tous les membres de la famille « ubiquitin-like » présentent une structure en « β -grasp fold » composée d'un feuillet β à 5 brins qui entourent une ou plusieurs hélices α (Hochstrasser, 2009). Cette famille rassemble deux types de protéines ubiquitin-like : le type I, comprenant les protéines activées puis conjuguées à leurs substrats que sont SUMO (Small Ubiquitin-like Modifier), NEDD8 (Neural precursor cell Expressed Developmentally Downregulated Protein 8), ATG8 (Autophagy-related protein 8), ATG12 (Autophagy-related protein 12), URM1 (Ubiquitin-related modifier 1), UFM1 (Ubiquitin-fold modifier 1), FAT10, et ISG15 (Interferon-stimulated Gene 15). Le type II comprend les protéines qui ne sont pas liées à des substrats et qui font partie de protéines multi-domaines comme HUB1 (Histone mono-Ubiquitination 1), ESC2 (Establishment Silent Chromatin 2) ou FUBI (FAU ubiquitin-like)(Cappadocia and Lima, 2018).

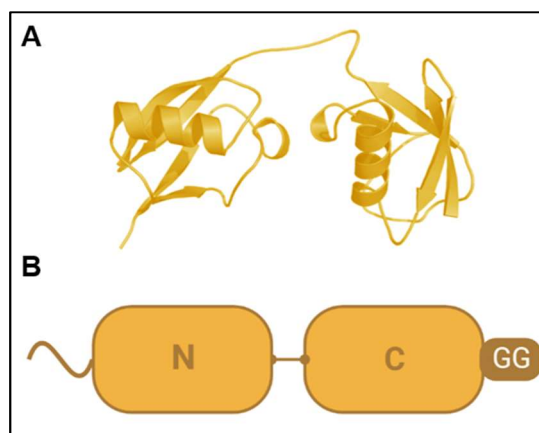


Figure 1 : Structure de la protéine FAT10 et représentation schématique (adaptée de Aichem *et al.*, 2018).

(A) Représentation en ruban de la structure de FAT10, mise en évidence par cristallographie aux rayons X et RMN. (B) Représentation schématique de FAT10 avec, de gauche à droite, l'extension N-terminale non structurée, le domaine « ubiquitin-like » (N) présent en N-terminal, le « linker », le domaine « ubiquitin-like » (C) présent en C-terminal et le domaine di-glycine (GG). Cette représentation schématique sera utilisée dans les figures suivantes pour représenter FAT10.

Les protéines de la famille des « ubiquitin-like » ont principalement été identifiées pour être des signaux de dégradation via le **26S protéasome**. En effet, le signal prédominant déclenchant la dégradation protéasomale consiste en la fixation de chaînes d'ubiquitines, or, les « ubiquitine-like » ayant une structure proche jouent également ce rôle. Le 26S protéasome est la protéase principale dans les cellules eukaryotes et est composé d'une unité 20S en forme de tonneau ainsi que de deux particules régulatrices (19S RP et PA700). L'unité 20S est composée de 4 anneaux, eux-mêmes composés de 7 sous-unités α aux extrémités et 7 sous-unités β au milieu du 20S. Les unités régulatrices 19S sont quant à elles composées d'une base et d'un couvercle. La base est composée de 6 ATPases : Rpt1-Rpt6, et de 3 non-ATPases : Rpn1 (nommée S2 chez l'humain), Rpn2 (S1) et Rpn13 (Adrm1). Rpn1 et Rpn13 sont des sites de fixation pour l'ubiquitine ou les ubiquitin-like. Le couvercle est composé de 9 sous-unités. À l'interface entre le couvercle et la base se retrouve l'unité Rpn10 (S5a) avec laquelle l'ubiquitine et FAT10 peuvent notamment interagir (**Fig. 2**) (Aichem and Groettrup, 2020).

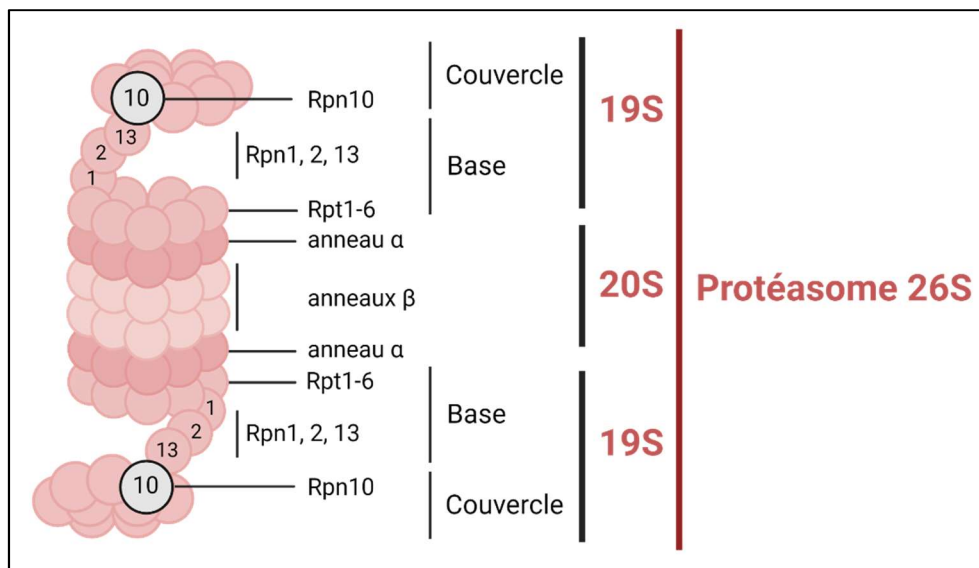


Figure 2 : Structure du 26S protéasome (adaptée d'Aichem and Groettrup, 2020).

b. Structure

La structure de FAT10 est donc proche de celle de l'ubiquitine mais comporte des différences avec cette dernière. En effet, la protéine est composée de deux domaines « ubiquitin-like » en N-

terminal et en C-terminal reliés entre eux par un linker court et flexible de 5 acides-aminés (Gao *et al.*, 2014). Ces deux domaines partagent respectivement 29% et 36% de leurs séquences en acides-aminés avec l'ubiquitine. L'identification précise de la structure de FAT10 est récente et a été laborieuse à cause de la nature insoluble de la protéine. Cependant, la mutation des résidus cystéines, sites privilégiés de formation de ponts disulfures rendant la protéine insoluble, a permis d'identifier la structure de la protéine par RMN (Résonance Magnétique Nucléaire) et par cristallographie. Cette étude confirme la présence de deux domaines repliés de la même façon que l'ubiquitine mais ayant des mouvements indépendants l'un de l'autre (Aichem *et al.*, 2018).

Le domaine en **C-terminal** de FAT10 lui permet d'interagir avec le domaine von Willebrand A (VWA) sur l'unité Rpn10 du protéasome 26S et d'être reconnu par ce dernier (**Fig. 3 (1)**) (Rani *et al.*, 2012). A l'extrémité C-terminale de FAT10 se retrouve aussi un motif diglycine (GG) indispensable pour l'activation de l'ubiquitine-like dans le processus d'interaction covalente avec ses substrats (Schmidtke, Aichem and Groettrup, 2014).

Le domaine en **N-terminal** permet à FAT10 d'interagir avec le domaine UBA (ubiquitin-associated) présent sur la protéine NUB1L (NEDD8 ultimate buster-1 long). NUB1L est une protéine induite par les interférons et composée d'un domaine ubiquitin-like en N-terminal et de 3 domaines UBA en C-terminal. NUB1L joue un rôle de « linker » entre le protéasome et FAT10 puisqu'elle interagit avec le domaine VWA de RPN10 pour former un complexe ternaire avec le protéasome 26S (**Fig. 3 (2)**)(Rani *et al.*, 2012). Enfin, à l'extrémité N-terminale de FAT10 se retrouve une extension heptapeptidique peu repliée et lâche importante pour la dégradation protéasomale dépendante de FAT10 (Aichem *et al.*, 2018).

La structure de FAT10 diffère aussi de celle de l'ubiquitine par son **repliement**. FAT10 est repliée de façon plus lâche que l'ubiquitine et comporte des peptides mobiles à ses extrémités. Or, la dégradation par le protéasome ne dépend pas uniquement de la fixation de motifs ubiquitine ou ubiquitin-like, il faut aussi que le repliement du substrat se relâche pour permettre une interaction avec l'anneau ATPase du 26S protéasome (**Fig. 3 (3)**). Cette fonction, habituellement réalisée par la protéine VCP (valosing-containing protein) pour les substrats ubiquitylés, n'est pas nécessaire pour les substrats FATylés qui sont déjà plus lâches notamment grâce à l'heptapeptide flexible en N-terminal de FAT10 (Aichem *et al.*, 2018).

Deux séquences humaines de *FAT10* sont publiées et ne diffèrent que d'un acide aminé en position 160 qui est soit une cystéine (FAT10 CYC, NCBI GeneBank Accession No NM_006398), soit une sérine (FAT10 SYC, NCBI GeneBank Accession No AF123050). Le séquençage de plusieurs lignées cellulaires a permis de confirmer l'expression des deux isoformes en fonction des lignées cellulaires. Les HEK293T, par exemple, expriment la forme CYC de FAT10 (Aichem, Boehm, *et al.*, 2019).

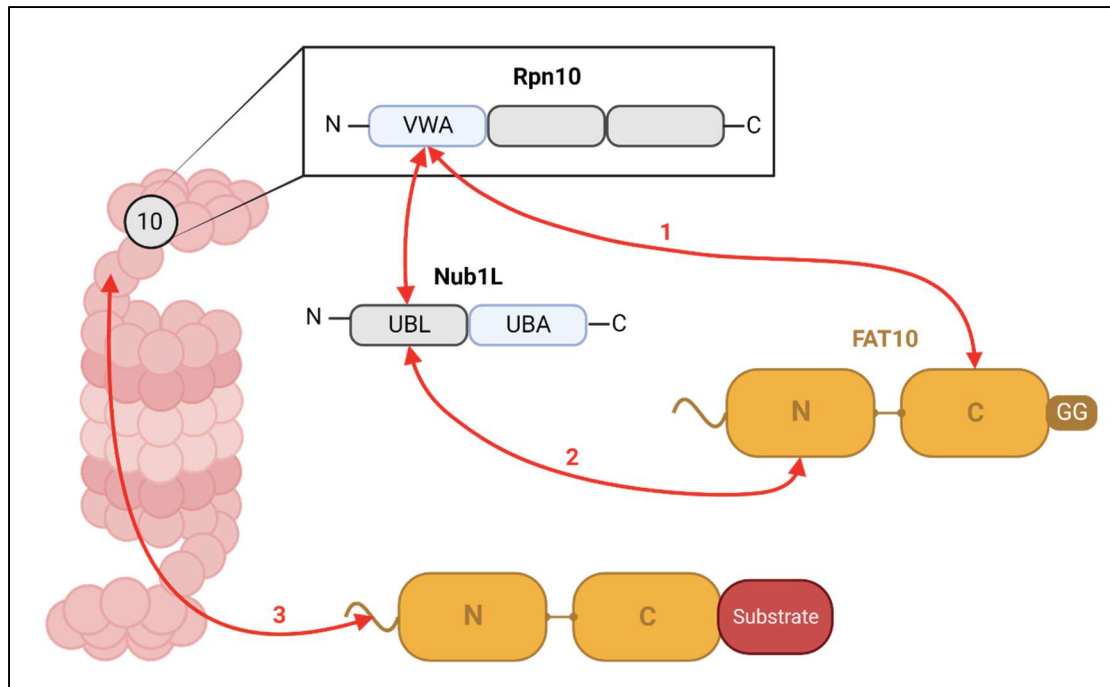


Figure 3 : Interaction de FAT10 avec le 26S protéasome (adaptée d'Aichem and Groettrup, 2020).

FAT10 peut interagir de 3 façons avec le 26S protéasome : **(1)** de façon directe via son extrémité C-terminale avec le domaine VWA de Rpn10 ; **(2)** de façon indirecte via son extrémité N-terminale avec le domaine UBL de Nub1L qui interagit à son tour avec le domaine VWA de Rpn10 ; **(3)** de façon directe avec l'anneau ATPase du 26S protéasome grâce à l'heptapeptide flexible de FAT10 à l'extrémité N-terminale.

c. Mécanismes d'action de FAT10

L'action de FAT10 sur ses substrats passe par son interaction avec ses derniers. En effet, une analyse par spectrométrie de masse a permis d'identifier 569 partenaires pour FAT10 dont 31% interagissent de façon covalente, les 69% restant interagissent de façon non-covalentes (Leng *et al.*, 2014). Comme énoncé précédemment, le rôle principal de FAT10 est la dégradation de ses substrats via la voie du protéasome qui peut être dépendante ou non de l'ubiquitine.

i. Interaction covalente

L'interaction covalente de FAT10 avec ses substrats se déroule d'une façon analogue à l'ubiquitylation et est appelée FATylation. Ce processus consiste en une cascade enzymatique faisant intervenir en premier lieu une **E1 ligase**. Lors de cette première étape, l'E1 active FAT10 en formant une liaison thioester avec sa partie C-terminale lors d'une réaction ATP-dépendante. Il a été démontré que l'E1 spécifique à la FATylation est UBA6 (Ubiquitin-like Modifier Activating Enzyme 6) (Chiu, Sun and Chen, 2007; Jin *et al.*, 2007). Cette enzyme n'a pour substrats que l'ubiquitine et FAT10 et se fixe avec une affinité plus importante à FAT10 par rapport à l'ubiquitine (Gavin *et al.*, 2012; Yuan *et al.*,

2022). Cette fixation est dépendante du linker présent entre les deux domaines ubiquitin-like de FAT10. Enfin, il a été montré que FAT10 se fixe à une autre E1 ligase : UBE1 (Ubiquitin-activating enzyme 1). Néanmoins, contrairement à UBA6, UBE1 n'agit pas comme une E1 pour FAT10 et la fixation de FAT10 à cette E1 module sa dégradation protéasomale (Bialas, Groettrup and Aichem, 2015).

La deuxième étape de la FATylation est réalisée par une **E2 ligase** et la ligase interagissant de façon exclusive avec UBA6 est USE1 (UBA6-specific E2 conjugating enzyme 1 ou UBE2Z pour E2 ubiquitin-conjugating enzyme Z). UBA6 transfère alors FAT10 à USE1 via une trans-thioesterification (Aichem *et al.*, 2010). De plus, USE1 est capable de s'auto-FATyler en *cis* sur la lysine 323 ce qui a pour effet de moduler sa dégradation via le protéasome. Cependant, l'auto-FATylation d'USE1 ne modifie pas l'activité de l'E2 ligase ni sa capacité à distinguer FAT10 des motifs ubiquitinylés (Aichem, Catone and Groettrup, 2014). La structure de FAT10 est importante dans ce processus de transfert E1-E2 puisqu'une mutation du linker empêche la FATylation de nombreux substrats de FAT10 dont USE1 suggérant une moins bonne interaction de FAT10 avec ces ligases en l'absence de linker (Aichem *et al.*, 2018). La mutation de l'extrémité C-terminale de FAT10, quant à elle, bloque la spécificité du transfert entre USE1 et UBA6 de FAT10 (Schelpe *et al.*, 2016).

Lors de l'ubiquitinylation, une dernière étape médiée par une **E3 ligase** permet le recyclage des protéines d'ubiquitine, mais, à ce jour l'identification d'une E3 spécifique de la FATylation n'est pas claire. En effet, plusieurs études ont démontré que le taux de dégradation de FAT10 s'aligne avec celui de ses substrats ce qui suggère une dégradation de l'ubiquitin-like avec ses substrats par la voie du protéasome et une absence de recyclage de FAT10 (Hipp *et al.*, 2005; Aichem, Catone and Groettrup, 2014). Cependant, l'existence d'une E3 dans le processus de FATylation est mentionnée dans plusieurs études comme nécessaire à la dégradation de certains substrats, tels que p62 par exemple (Aichem *et al.*, 2012). Récemment une E3 ligase, Parkin, impliquée dans la FATylation a été identifiée *in vitro* dans une lignée cellulaire humaine de neurones et semble jouer un rôle dans la fixation de FAT10 spécifiquement sur certaines cibles comme Mfn2 (Mitofusin 2)(Roverato *et al.*, 2021).

Enfin, il n'y a pas d'élément à ce jour indiquant que la dégradation via la FATylation nécessite la fixation de plusieurs protéines FAT10 comme cela peut être le cas pour l'ubiquitine. De façon intéressante, il a été démontré que certains substrats de FAT10 sont multi-mono-FATylés comme p62 (Aichem *et al.*, 2012).

ii. Interaction non-covalente

FAT10 est aussi capable d'interagir de façon non-covalente avec ses substrats. Pourtant, il est paradoxal de constater que cette forme d'interaction est peu étudiée. En effet, la proportion FATylée

d'un substrat donné est de 5-10% ce qui laisse une grande partie non-modifiée susceptible d'interagir non-covalamment avec FAT10 (Bialas *et al.*, 2019). Certains substrats qui interagissent covalamment, comme UBE1, p62, eEF1A1 (Eukaryotic Translation Elongation Factor 1 α 1), JunB, OTUB1 (OTU deubiquitinase), PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) et p53 interagissent aussi de façon non-covalente mais cet aspect est peu étudié (Li *et al.*, 2011; Aichem *et al.*, 2012; Yu *et al.*, 2012; Aichem, Catone and Groettrup, 2014; Chen, W. E. I. Zhang, *et al.*, 2018; Aichem, Sailer, *et al.*, 2019; Bialas *et al.*, 2019). Cette interaction non-covalente semble se faire via le domaine N-terminal de FAT10 (Liu *et al.*, 1999).

d. Expression et régulation de FAT10

FAT10, contrairement à l'ubiquitine, n'est exprimée à l'**état basal** que dans les organes du système immunitaire tels que le thymus, les ganglions lymphatiques, et la rate mais aussi dans le foie foetal (Lee *et al.*, 2003). L'expression constitutive de FAT10 dans ces tissus est liée à l'expression du gène dans certaines cellules immunes : les cellules T CD8⁺, les cellules dendritiques et les cellules « Natural Killer » (NK) dans le sang humain mais aussi dans les cellules T régulatrices, macrophages et monocytes de la rate de souris.

Cependant, il a été démontré que l'expression de FAT10 pouvait être induite dans de nombreux types cellulaires en réponse à des stimuli **pro-inflammatoires**. En effet, sur le promoteur de *FAT10* se trouve un domaine ISRE (Interferon Sequence Responsive Element) permettant la surexpression de FAT10 en réponse à un traitement aux cytokines pro-inflammatoires (J. Oliva *et al.*, 2010). Ainsi, un traitement au TNF α (Tumor Necrosis Factor α) induit l'expression de FAT10 dans plusieurs lignées cellulaires cancéreuses ainsi que dans des HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells) isolées (Raasi *et al.*, 1999). Il a aussi été démontré qu'un co-traitement TNF α /IFN γ induit FAT10 dans les cellules immunes circulantes isolées du sang humain (Schregle *et al.*, 2018), et dans la lignée hépatocytaire HepG2. Dans les HepG2, le co-traitement TNF α /IL6 (Interleukine 6) induit également l'expression de FAT10 et il a été démontré que cette induction passe par la voie NF- κ B (Nuclear Factor κ B)/STAT3 (Signal Transducer and Activator Transcription 3). En effet, le promoteur de *FAT10* comporte des sites de fixation à NF- κ B/STAT3 qui, une fois activés par des cytokines comme TNF α , IFN γ et IL6, induisent la transcription de *FAT10 in vitro* et *in vivo* (Choi, Kim and Yoo, 2014a). De plus, dans les hépatocytes cancéreux *in vivo* et *in vitro*, la surexpression de GRP78 (78kDa Glucose Regulated Protein), une protéine de la classe des HSP70 (70kDa Heat Shock Proteins) ayant un rôle de chaperonne du RE (réticulum endoplasmique), induit la voie NF- κ B via la phosphorylation d'I κ K α / β (I κ Kinase α / β). Cette activation de la voie NF- κ B conduit à l'induction de l'expression de FAT10 et favorise la progression de l'HCC (Luo *et al.*, 2018).

L'activation de la voie NF- κ B peut être **inhibée** grâce à la silibinine, une molécule connue pour inhiber les voies de MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase), STAT, NF- κ B et AP-1 (Activator Protein 1) induites par TNF α et IFN γ . La silibinine inhibe donc indirectement l'expression de FAT10 (Gao *et al.*, 2015). Cette dernière peut également être bloquée par un inhibiteur synthétique de JAK2 (Janus Kinase 2), AZ960. En effet, l'inhibition de JAK2 par l'AZ960 bloque STAT1/ 3 et 5 ce qui résulte en une diminution de l'activité du promoteur de FAT10 (**Fig. 4**)(Reznik *et al.*, 2019).

Il a également été démontré que la transcription de FAT10 peut être régulée par le facteur de transcription **p53**. En effet, p53 est une phosphoprotéine nucléaire régulant la transcription de nombreux gènes en se fixant sur le promoteur de ses cibles, entrant ainsi en compétition avec d'éventuels activateurs. L'étude des mécanismes de régulation de FAT10 a révélé que p53 se fixe sur le promoteur de FAT10 et réprime son activité. Par conséquent, l'activité du promoteur de FAT10 est diminuée dans les lignées cellulaires p53 positives comme les HepG2, contrairement aux cellules p53 négatives, comme les Hep3B (Zhang, Jeang and Lee, 2006).

Une fois exprimée, le **compartiment cellulaire** dans lequel la protéine FAT10 se localise n'est pas identifié clairement et des résultats contradictoires ont été obtenus. Dans les cellules, la protéine semble se localiser dans le noyau, le cytoplasme et la mitochondrie *in vitro* et *in vivo* (Raasi, Schmidtke and Groettrup, 2001; Lee *et al.*, 2003; Snyder *et al.*, 2009). Plus précisément dans les hépatocytes, les marquages de la protéine par immunofluorescence démontrent une localisation diffuse mais aussi sous forme d'agrégats dans des conditions de stress prolongées (traitement cytokinique chronique (Oliva *et al.*, 2010) ou traitement avec un composé porphyrinogénique, le DDC (3,5-diethoxycarbonyl-1,4-dihydrocollidine)(Oliva *et al.*, 2010). De façon surprenante, Oliva J et al, observent la présence de Fat10 dans les hépatocytes binucléées mais dans un seul des noyaux de ces cellules dans le foie des souris nourries au DDC. Ce phénomène inexplicable suggère un mécanisme complexe de translocation de FAT10 du cytoplasme au noyau (Oliva *et al.*, 2010).

Une fois exprimée, la protéine FAT10 a une **demi-vie** courte, estimée à 2 heures environ, qui est certainement due au fait que FAT10 est dégradée en même temps que ses substrats (Raasi, Schmidtke and Groettrup, 2001). De plus, l'interaction de FAT10 avec Nub1L accélère sa dégradation (Hipp *et al.*, 2004; Schmidtke, Kalveram and Groettrup, 2009).

Enfin, l'expression de FAT10 est régulée en fonction du **cycle cellulaire**. En effet, l'expression génique de *FAT10* est réprimée en phase G2/M du fait de la diminution de l'activité de son promoteur lors de cette phase. Les auteurs suggèrent que cette répression en phase G2/M empêche l'interaction de FAT10 avec MAD2 (Mitotic Arrest Deficient 2), protéine du « spindle assembly checkpoint » (Lim, Zhang and Lee, 2006). En effet, FAT10 interagit avec MAD2 et induit sa dégradation protéasomale, ce qui conduit à une répartition aberrante des chromosomes lors de la division cellulaire. Ainsi, l'absence de FAT10 lors de la phase G2/M prévient cette aneuploïdie (Liu *et al.*, 1999).

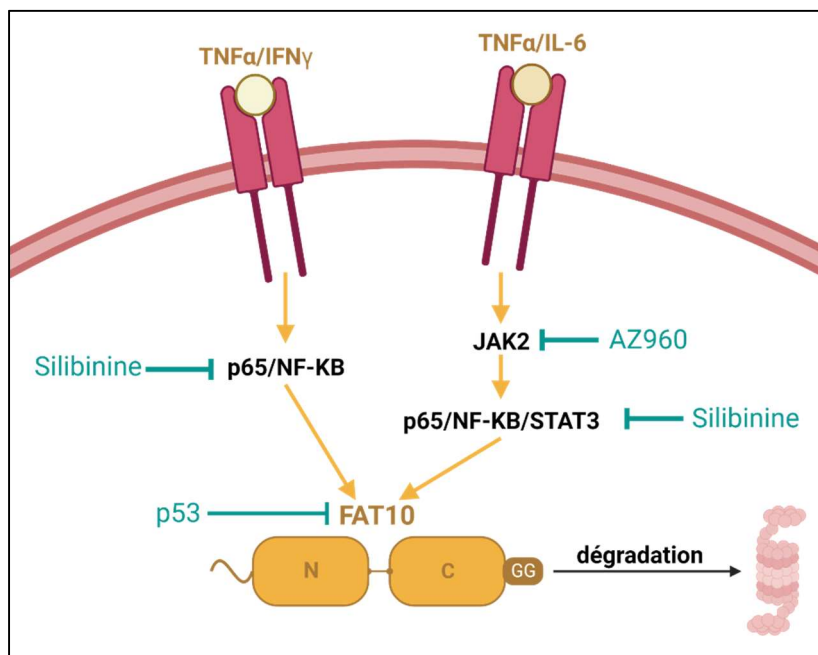


Figure 4 : Régulation de FAT10 (adaptée d'Aichem and Groettrup, 2016).

L'expression de FAT10 est principalement induite par les voies de signalisation pro-inflammatoire (jaune). Cette expression peut être bloquée par des inhibiteurs indirects tels que la silibinine ou l'AZ960, le suppresseur de tumeur p53 réprime l'expression de FAT10 (bleu). Une fois exprimée, la protéine FAT10 est principalement dégradée via la voie du protéasome.

2) Action sur les partenaires d'interaction

a. Description du rôle d'ubiquitin-like

Le rôle principal de FAT10 consiste à dégrader ses partenaires via les principales voies de dégradation que sont la voie protéasomale et la voie de l'autophagie.

i. Dégradation via la voie du 26S protéasome

La fixation de FAT10 sur ses partenaires, comme la fixation de l'ubiquitine, est un signal de dégradation via la voie du protéasome. Cette dégradation peut être **dépendante de l'ubiquitine**. En effet, l'ubiquitine se fixe à FAT10 et S. Buchsbaum et al ont démontré que cette fixation est responsable de la dégradation de FAT10 (**Fig. 5**)(Buchsbaum, Bercovich and Ciechanover, 2012).

Cependant, ce résultat est nuancé par d'autres observations démontrant que l'adressage des partenaires de FAT10 au protéasome peut aussi se faire **indépendamment de la fixation de l'ubiquitine**. En effet, comme mentionné précédemment, FAT10 interagit avec Nub1L (Hipp *et al.*,

2004). Or, Nub1L interagit, d'une part, avec la sous-unité Rpn1 du protéasome 26S via son motif « ubiquitin-like » en N-terminal et, d'autre part, avec FAT10 via son domaine UBA en C-terminal. Ainsi, le lien formé entre FAT10 et le protéasome 26S par Nub1L permet à FAT10 de dégrader ses partenaires (**Fig. 5 (2)**)(Hipp *et al.*, 2004; Schmidtke, Kalveram and Groettrup, 2009). De plus, comme mentionné précédemment, l'extrémité C-terminale de FAT10 interagit directement avec le domaine VWA de la sous-unité Rpn10 du protéasome 26S menant à une dégradation de FAT10 et de ses partenaires. Ce mécanisme est complémentaire de la fixation Nub1L dépendante de FAT10 sur Rpn1 et il laisse le motif N-terminal de FAT10 libre. En effet, la fixation directe de FAT10 sur Rpn10 induit une dégradation lente de l'ubiquitin-like en l'absence de Nub1L (**Fig. 5 (1)**). Or, cette dégradation est accélérée lorsque les complexes FAT10/Nub1L se fixent sur Rpn1 avec un transfert de FAT10 sur Rpn10 via son motif N-terminal. Enfin, les auteurs suggèrent un modèle « facilitateur » où FAT10 et Nub1L se fixent respectivement sur Rpn10 et Rpn1 et Nub1L de façon indépendante et simultanée (**Fig. 5 (3)**). La proximité des deux protéines aux voisinage du 26S protéasome favoriserait alors la dégradation de FAT10 (Rani *et al.*, 2012).

Lors d'une réaction inflammatoire, l'unité 20S du protéasome 26S est remplacée par l'immunoprotéasome composé de 3 sous-unités peptidolytiques : β 1i (LMP2, Latent Membrane Protein 2), β 2i (MECL-1, Multicatalytic Endopeptidase Complex-Like 1), et β 5i (LMP7). Cette conversion induit une augmentation de l'activité « chemotrypsin-like » et « trypsin-like » de l'immunoprotéasome et supprime son activité « caspase-like » afin d'augmenter la production de ligands de classe MHC I nécessaire à la présentation des antigènes. De plus, l'immunoprotéasome a été identifié comme étant impliqué dans la pathogenèse de maladies inflammatoires, telles que l'arthrite rhumatoïde ou les maladies inflammatoires de l'intestin mais aussi le diabète de type 2. Or, il a été démontré que FAT10 est dégradée de la même façon dans des cellules HEK293T exprimant le protéasome 26S ou l'immunoprotéasome (Schmidtke *et al.*, 2017). Cela suggère que la dégradation des complexes FATylés n'est pas affectée par la conversion du protéasome 26S en immunoprotéasome.

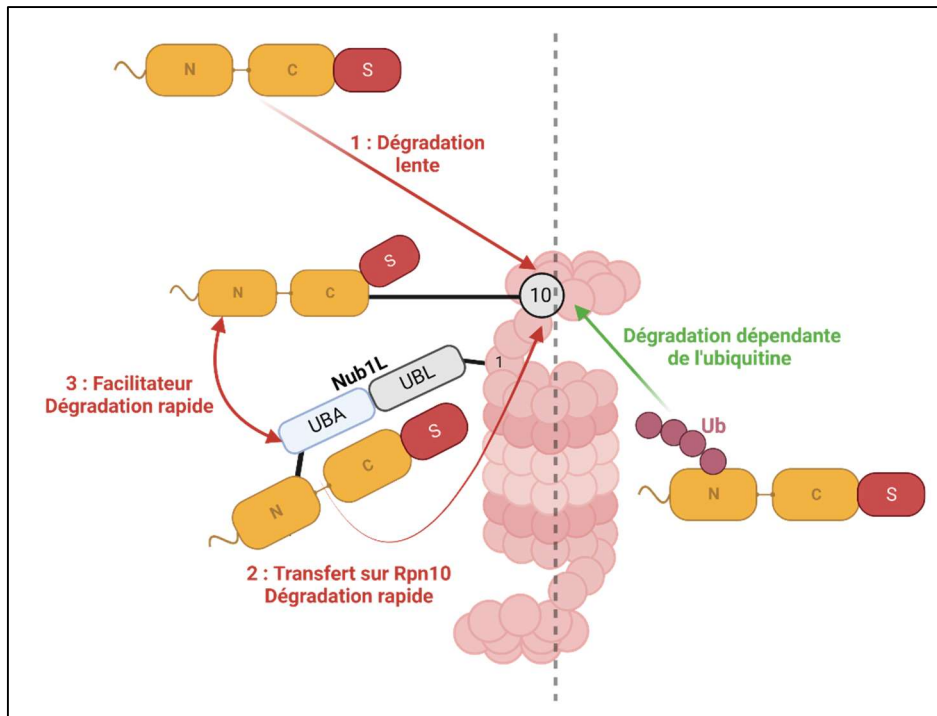


Figure 5 : Dégradation des substrats FATylés par le protéasome 26S (adaptée de Rani *et al.*, 2012).

La dégradation des substrats FATylés avec le 26S protéasome peut avoir lieu de façon indépendante de la fixation de l'ubiquitine par différents mécanismes (représentés en rouge à gauche) : **(1)** lentement par l'interaction directe de FAT10 avec Rpn10 ; **(2)** rapidement par l'intermédiaire de Nub1L qui interagit avec Rpn1 et réalise un transfert des complexes FATylés sur Rpn10 ; **(3)** de façon facilitée lorsque FAT10 et Nub1L interagissent

ii. Dégradation via l'autophagie

La voie de dégradation protéasomale est la voie de dégradation principale des protéines. Cependant, quand la capacité de dégradation du 26S protéasome est dépassée, des mécanismes de **compensation** se mettent en place. L'une de ces voies de compensation est la macroautophagie qui se déroule en plusieurs étapes. La première étape de la macroautophagie est la formation d'un autophagosome à partir de mécanismes membranaires dynamiques : une portion de membrane, appelée le phagophore, s'invagine et s'étend pour former une sphère qui englobe une partie du cytoplasme contenant les éléments à dégrader. Cet autophagosome fusionne ensuite avec le lysosome, une organelle ayant un contenu acide composé notamment d'hydrolases, pour former un autophagolysosome. Le contenu de cette vésicule est alors dégradé par les hydrolases et les produits de dégradation sont renvoyés dans le cytoplasme pour servir de source d'énergie notamment (Ohsumi, 2014).

Ainsi, lors d'un blocage de la voie protéasomale, les protéines malformées peuvent être redirigées vers des inclusions appelées agrésomes via un transport le long du réseau microtubulaire

impliquant les complexes dynéines. Ces inclusions sont ensuite dégradées par la voie de la macroautophagie. Or, la prise en charge des protéines polyubiquitinylées par les complexes dynéines fait intervenir la protéine **HDAC6** (Histone deacetylase 6) qui, d'une part, se lie aux complexes dynéines et, d'autre part, se lie aux protéines poly-ubiquitinylées via son motif à doigt de zinc (« zinc finger »)(Kawaguchi *et al.*, 2003). De façon intéressante, une interaction non-covalente entre FAT10 et HDAC6 a été démontrée dans la lignée cellulaire HEK293T uniquement dans des conditions d'inhibition du protéasome. L'étude de l'interaction révèle que le domaine « zinc finger » d'HDAC6 et son unité catalytique 1 sont tous les deux capables de se fixer à FAT10. La fixation d'HDAC6 se fait sur les deux domaines ubiquitin-like de FAT10 et non par son domaine diglycine C-terminal. Cette interaction induit alors une relocalisation des complexes FATylés dans un agrésome périnucléaire via les réseaux de microtubules. Les auteurs démontrent qu'HDAC6 est nécessaire à la formation des agrésomes contenant FAT10 (Kalveram, Schmidtke and Groettrup, 2008). Un autre facteur reliant FAT10 à la voie de l'autophagie est p62 (ou sequestosome 1, SQSTM1). Comme mentionné précédemment, FAT10 interagit avec p62 et favorise sa dégradation (Aichem *et al.*, 2012), or, p62 est une protéine impliquée dans la dégradation des protéines polyubiquitinylées via l'autophagie. En effet, le domaine UBA en C-terminal de p62 se fixe aux chaînes d'ubiquitine qui se forment sur les protéines à dégrader. Ensuite, p62 interagit avec la protéine LC3 (1A/1B Light Chain 3) qui se trouve à la membrane des autophagosomes dirigeant ainsi les protéines poly-ubiquitinylées vers la dégradation lysosomale (Pankiv *et al.*, 2007). De façon intéressante, p62 interagit également avec le protéasome 26S via son domaine Phox-BEM1 (Bud Emergence 1) et est aussi capable d'adresser des protéines polyubiquitinylées à cette voie de dégradation (**Fig. 6**)(Myeku and Figueiredo-Pereira, 2011).

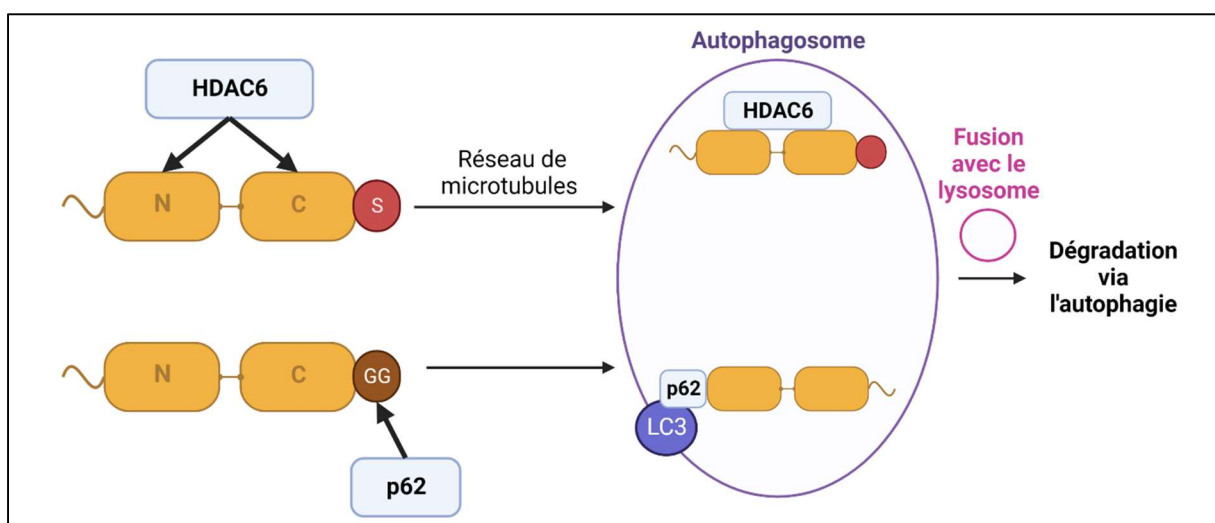


Figure 6 : Dégradation des substrats FATylés par la voie de l'autophagie (adaptée de Basler *et al.*, 2015).

b. Autres modes d'action de FAT10

Au-delà de son rôle de signal de dégradation, FAT10 est aussi capable de stabiliser ses partenaires ou même de moduler leur activité indépendamment de leur dégradation.

La stabilisation de certains partenaires par FAT10, phénomène contre-intuitif de prime abord, a été étudiée. En effet, une **compétition entre FAT10 et l'ubiquitine** a été mise en évidence par l'étude de certains de ses substrats comme eEF1A1 (Liu *et al.*, 2016), la β -caténine (Yuan *et al.*, 2014), la survivine (Dong *et al.*, 2016), ZEB2 (Zinc-finger E-box Binding homeobox 2)(Zou *et al.*, 2018), YAP1 (Yes-Associated Protein 1)(Yi *et al.*, 2020) ou Cav3 (Cavéoline 3)(Zhou *et al.*, 2018). Pour ces partenaires, la fixation de l'ubiquitine sur les résidus lysines est diminuée par FAT10 qui se lie aux mêmes résidus avec une meilleure affinité. Ici, FAT10 antagonise l'ubiquitine et la dégradation via le protéasome en aval.

De plus, FAT10 interfère **avec la SUMOylation**. En effet, l'interaction non-covalente de FAT10 avec SUMO bloque la fixation de SUMO sur ses substrats. Le mécanisme de cette inhibition passe par l'interaction non-covalente de FAT10 avec le domaine d'adénylation du dimère AOS1 (aussi SAE1 SUMO-activating enzyme 1)-UBA2 (aussi SAE2) qui est l'E1 ligase impliquée dans la SUMOylation. Or, le domaine d'adénylation du dimère est le domaine auquel se fixe SUMO. FAT10 bloque ainsi la SUMOylation en bloquant l'interaction de SUMO avec son E1 ligase. Cette inhibition de la SUMOylation se répercute sur la régulation de substrats SUMOylés. L'activité de JunB ou des corps PML (Promyelocytic Leukemia), induite par la SUMOylation, est inhibée en présence de FAT10 (Li *et al.*, 2011; Aïchem, *et al.*, 2019).

La fixation de FAT10 peut aussi avoir un **impact direct sur ses partenaires**. Par exemple, la FATylation de p53 entraîne une modification de la conformation de la protéine. Ce changement de conformation induit par FAT10 n'altère pas la translocation de p53 dans le noyau, nécessaire à son activité, mais bloque l'activité de p53 directement. Sachant que p53 régule négativement la transcription de FAT10, ce mécanisme suggère une boucle de répression entre les deux protéines (Li *et al.*, 2011). De plus, l'interaction non-covalente de FAT10 avec RIG-I (retinoic acid inducible gene 1) interfère avec la fonction anti-virale de la protéine qui est nécessaire à la production d'interféron de type I lors d'une infection virale. Deux mécanismes ont été proposés pour expliquer le blocage de la voie RIG-I par FAT10. Il a d'abord été avancé que FAT10, en se fixant sur les domaines CARD (Caspase Activation and Recruitment Domain) de RIG-I, favorise la précipitation de RIG-I sous forme insoluble le rendant moins actif (Nguyen *et al.*, 2016). Une autre étude démontre que l'interaction de FAT10 avec RIG-I bloque l'ubiquitylation des domaines CARD qui font partie du mécanisme d'activation de RIG-I (Wang *et al.*, 2019).

Ainsi, la fixation de FAT10 sur ses partenaires, qu'elle soit covalente ou non, n'est pas seulement un signal de dégradation mais elle peut aussi conduire à la désactivation ou même parfois à la

stabilisation de ses partenaires (**Fig. 7**). L'étude de l'impact de FAT10 sur ses différents partenaires a alors permis de déterminer son rôle physiologique et pathophysiologie.

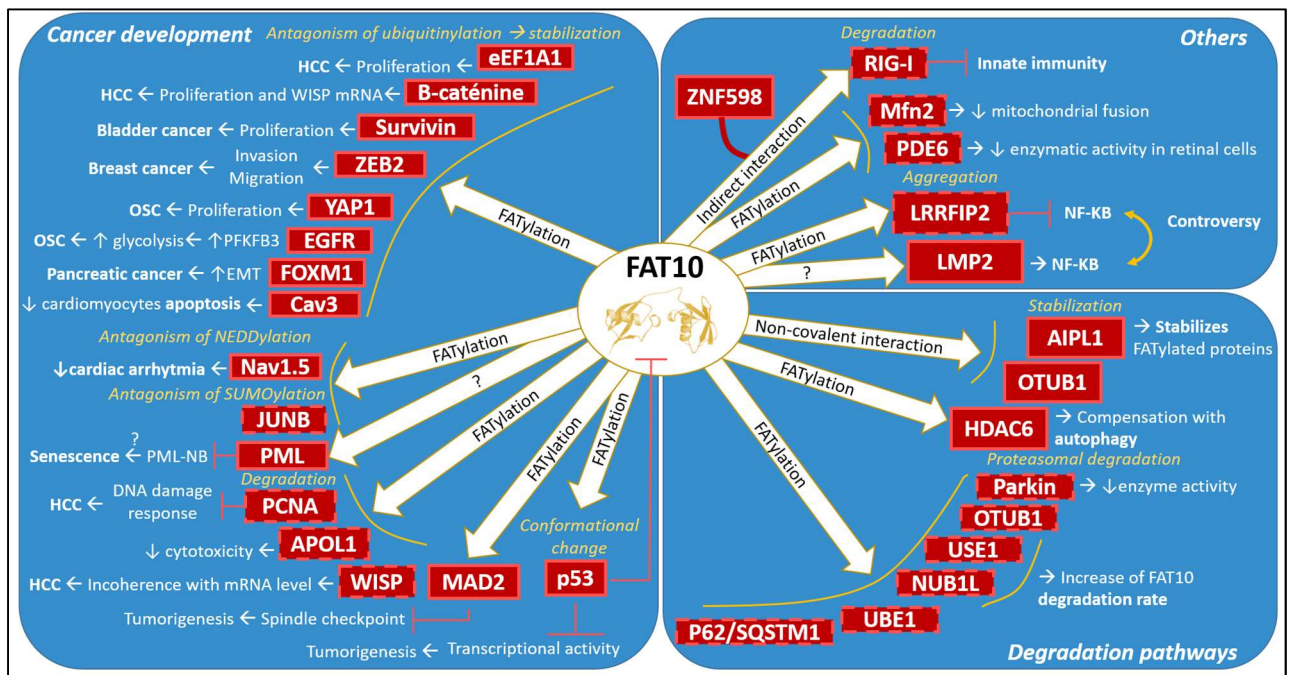


Figure 7 : Cibles de FAT10 caractérisées à ce jour (adaptée d'Aichem A *et al.*, 2020).

La revue bibliographique des cibles de FAT10 caractérisée à ce jour a été schématisée ci-dessus. Les cadres bleus désignent le domaine dans lequel les cibles ont été étudiées (majoritairement dans le cadre de l'étude de cancers). Les flèches allant de FAT10 vers ses cibles indiquent le type d'interaction de FAT10 avec chaque cible lorsqu'il est connu. En jaune italique est indiqué le mécanisme par lequel FAT10 agit sur les différentes cibles. Les cibles sont entourées de cadres rouges en traits pleins lorsqu'elles sont stabilisées ou en traits pointillés lorsqu'elles sont dégradées. Enfin, l'impact physiologique de la modulation de ses cibles par FAT10 est indiqué à côté de chaque protéine, lorsqu'il est connu.

3) Rôles de FAT10

L'étude du mécanisme d'action de FAT10 ainsi que l'étude de ses cibles a permis de mieux comprendre les rôles physiologiques et physiopathologiques que joue l'ubiquitine-like dans l'organisme (**Fig. 8**).

a. Rôles physiologiques de FAT10

i. Rôle dans l'immunité

FAT10 est exprimée de façon constitutive dans les organes du système immunitaire et plus précisément dans certaines populations de cellules immunes. De ce fait, son rôle dans l'immunité a été étudié.

Le rôle que joue FAT10 dans **l'immunité adaptative** a d'abord été étudié. Il est établi que la fixation de FAT10 sur les résidus N-terminaux d'antigènes viraux favorise leur dégradation protéasomale ainsi que la présentation de leurs épitopes aux molécules du MHC-I (Major histocompatibility complex class I)(Ebstein, Lehmann and Kloetzel, 2012). La voie du MHC-I permet la présentation d'antigènes qui sont des peptides issus principalement de la dégradation via le protéasome aux lymphocytes T cytotoxiques (Basler, Buerger and Groettrup, 2015). Par exemple, l'étude de FAT10 dans les mTECs (medullary Thymic Epithelial Cells) montre que l'ubiquitin-like est constitutivement exprimée dans ces cellules et elle favorise la présentation des peptides à ces cellules (Buerger *et al.*, 2015). La fixation de FAT10 est aussi impliquée dans la voie du MHC-II, dont les antigènes proviennent de la dégradation par la voie de l'autophagie et sont présentés aux cellules T CD4+. En effet, comme expliqué précédemment, FAT10 interagit avec p62, acteur majeur de l'autophagie (Aïchem *et al.*, 2012). De plus, FAT10 peut, comme le fait l'ubiquitine, se fixer à la surface de bactéries telles que *Salmonella Typhimurium*, et déclencher leur autophagie (qualifiée de xénophagie) via l'interaction avec p62. La déficience en *Fat10* chez la souris favorise alors l'infection bactérienne (Spinnenhirn *et al.*, 2014).

FAT10 joue aussi un rôle dans **l'immunité innée** puisqu'il régule négativement la sécrétion d'interféron de type 1 via le blocage de la voie RIG-I mentionné précédemment. En effet, l'ADN viral est reconnu via cette voie ce qui active la voie NF- κ B en favorisant la production d'interféron de type 1 pour promouvoir l'inflammation. FAT10 inhibe donc ce processus en désactivant RIG-I (Nguyen *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2019). FAT10 régule aussi la production d'interféron de type 2 par les cellules T CD8+. L'étude de souris infectées avec le virus LCMV (lymphocytic choriomeningitis virus) révèle que FAT10 régule l'équilibre entre IFN type 1 et 2 chez des souris infectées LCMV en diminuant la sécrétion d'IFN α et IFN β et en augmentant la sécrétion d'IFN γ (Mah, Roverato and Groettrup, 2020).

Enfin, il a été démontré que l'expression de FAT10 est induite dans les **cellules dendritiques** en réponse à plusieurs stimuli de maturation tels qu'un cocktail de cytokines pro-inflammatoires, un traitement LPS (Lipopolysaccharide), un traitement Poly(I :C) (copolymère d'acides polyinosinique et polycytidylique) ou un traitement avec le CD40L (ligand CD40). De plus, la protéine FAT10 et son activité de conjugaison à ses partenaires est aussi augmentée dans ces conditions et contribue, selon les auteurs, au switch de la fonction de capture d'antigène à celle de dégradation puis de présentation des cellules dendritiques (Ebstein *et al.*, 2009). Enfin, les **lymphocytes** des souris déficientes pour FAT10 sont plus sensibles à l'apoptose que ceux des souris contrôles suggérant un rôle protecteur de FAT10 pour ces cellules de l'immunité innée (Canaan *et al.*, 2006).

ii. Rôle de cardioprotection

FAT10 est exprimée dans le myocarde humain et murin à l'état basal et **protège les cardiomyocytes de l'apoptose** en réponse à l'ischémie. En effet, plusieurs mécanismes impliquant FAT10 ont été proposés dans le but d'expliquer le rôle cardioprotecteur de FAT10. D'abord, l'expression de FAT10 augmente en réponse à l'ischémie *in vitro* et *in vivo* et bloque l'expression du micro ARN miR34-a via l'inhibition de p53. L'inhibition de l'expression de miR34-A favorise alors l'expression de la protéine anti-apoptotique BCL2 (B cell lymphoma 2)(Peng *et al.*, 2013). De plus, un autre mécanisme de protection cardiaque par FAT10 a été proposé par Wan R et al. Selon les auteurs, FAT10 entre en compétition avec la SUMOylation et favorise la dégradation protéasomale de SIRT1 (sirtuin 1), une déacétylase connue pour favoriser l'autophagie (Wan *et al.*, 2021). Enfin, la FATylation entre également en compétition avec l'ubiquitinylation de Cav3, inhibant ainsi la dégradation protéasomale de cette protéine protectrice contre l'apoptose des cardiomyocytes et limitant les lésions cardiaques (Zhou *et al.*, 2018). De la même façon, FAT10 inhibe l'ubiquitinylation et la NEDDylation (fixation de l'ubiquitin-like NEDD4-2) de la protéine Nav1.5, canal sodique voltage-dépendant nécessaire à la bonne contraction des cardiomyocytes. La FATylation de Nav1.5 **protège ainsi de l'arythmie ventriculaire** induite par l'ischémie (Liu *et al.*, 2021).

Malgré ses fonctions immunitaires et cardioprotectrices, l'expression de FAT10 a aussi largement été étudiée dans le cadre de pathologies associées à un contexte pro-inflammatoire favorable à l'expression de l'ubiquitin-like.

b. Rôles physiopathologiques de FAT10

i. Rôle d'oncogène et paradoxe pro-apoptotique

La résistance à l'apoptose promue par FAT10 et observée dans le cœur peut aussi, dans d'autres organes, favoriser le développement de pathologies et notamment de **cancers**. En effet, il a été démontré que FAT10 est surexprimée dans un grand nombre de tumeurs issues d'HCC (Hepatocellular Carcinoma) et est même qualifiée d'oncogène (Lee *et al.*, 2003). Cette surexpression semble être précoce puisque dans un modèle de souris C3H nourries au DDC, la surexpression de FAT10 est observée au niveau des lésions préneoplasiques (Oliva et al., 2008). La surexpression de GRP78, une chaperonne du réticulum endoplasmique jouant un rôle crucial dans le contrôle qualité des protéines, est observée dans les hépatocytes cancéreux humains et conduit à l'activation de la transcription de FAT10 en activant la voie NF- κ B (Luo *et al.*, 2018).

Les rôles de FAT10 dans la carcinogenèse des hépatocytes sont multiples car son expression est associée à une induction de la **prolifération** via son interaction avec eEF1A1 (Liu *et al.*, 2016) et

avec la β -caténine (Yuan *et al.*, 2014). FAT10 contribue aussi à la carcinogénèse en inhibant la réparation des **dommages à l'ADN**, via son interaction avec PCNA (Chen, W. Zhang, *et al.*, 2018). De plus, la surexpression de FAT10 inhibe l'activité de **p53**, suppresseur de tumeur, ce qui renforce le caractère malin des hépatocytes (Li *et al.*, 2011; Choi, Kim and Yoo, 2014). Enfin, FAT10 interfère avec le « **spindle assembly checkpoint** », un complexe protéique assurant la correcte répartition des chromosomes lors de la métaphase, en interagissant avec MAD2 (Liu *et al.*, 1999). Lors de la surexpression de FAT10, MAD2 ne se localise plus au niveau du kinetochore ce qui conduit à une aneuploïdie chromosomale (Ren *et al.*, 2006). Cette mauvaise répartition chromosomale est alors associée à une augmentation des capacités prolifératives et d'invasion des cellules (Theng *et al.*, 2014). FAT10 favorise ainsi la carcinogénèse dans les cellules tumorigéniques et non-tumorigéniques (Gao *et al.*, 2014) et a aussi été associée à d'autres cancers que l'HCC, tels que l'ostéosarcome (Yi *et al.*, 2020), le gliome (Dai *et al.*, 2016), l'adénome canalaire pancréatique (Sun *et al.*, 2014), le cancer du sein (Zou *et al.*, 2018), de la vessie (Dong *et al.*, 2016) et du colon (Qing *et al.*, 2011).

Paradoxalement et contrairement à ce qui est observé dans les cellules cardiaques et dans les hépatocytes, FAT10 peut tout de même **favoriser l'apoptose** dans d'autres cellules. En effet, la surexpression stable de FAT10 dans la lignée HeLa induit l'apoptose de cellules. Ce phénomène passe par la voie des caspases et est atténué par la mutation du domaine di-glycine de FAT10 suggérant un rôle de la FATylation dans le processus d'apoptose (Raasi, Schmidtke and Groettrup, 2001). Ce rôle pro-apoptotique se confirme *in vivo* dans les cellules épithéliales tubulaires rénales d'un modèle murin de néphropathie induite par infection virale (Ross *et al.*, 2006).

ii. Maladies neurodégénératives

FAT10 a aussi été identifiée dans le cadre des maladies neurodégénératives. En effet, lors du développement de ces maladies, une **accumulation de protéines** non dégradées s'agrègeant ensemble est observée et participe à la pathogénèse. Par exemple, l'agrégation de protéines, de type polyglutamine est caractéristique de maladies héréditaires comme la maladie d'Huntington ou l'amyotrophie spinobulbaire. Or, FAT10 interagit avec ces polyglutamines avec une forte affinité ce qui suggère un rôle de FAT10 dans l'agrégation des polyglutamines (Nagashima *et al.*, 2011). De plus, un parallèle entre la formation d'agrégats protéiques dans les hépatocytes, les corps de Mallory (MDB, Mallory-Denk Bodies), et dans les neurones a été proposé dans une revue écrite par French SW *et al.* Dans cette revue, les auteurs proposent un rôle pour FAT10 dans la formation des agrégats observés dans le cerveau de patients atteints de maladie d'Alzheimer qui serait similaire à celui établi dans le foie. Cette comparaison s'appuie notamment sur les résultats d'une thèse intitulée « The modulation of Tau aggregation in a cell model of Alzheimer's disease by the proteasome adaptor protein NUB1 »

écrite par Emma Richet (2012, University College London) et montrant une surexpression de FAT10 dans le cortex entorhinal et l'hippocampe des patients atteints de maladie d'Alzheimer (French *et al.*, 2016). Cette surexpression est probablement due à l'inflammation qui se développe dans le cerveau quand l'amyloïde β , protéine s'accumulant et formant des plaques d'amyloïde, active les cellules gliales qui se mettent à sécréter de façon chronique des cytokines pro-inflammatoires, telles que TNF α , IL1 α et β (Ozben and Ozben, 2019).

Plus récemment, une E3-ligase pour FAT10 a été identifiée dans une lignée cellulaire de neuroblastes humains. Cette ligase, appelée **Parkin**, interagit avec FAT10 et conduit à la FATylation de Mfn2, une protéine impliquée dans la fusion mitochondriale. La surexpression de FAT10 dans ces cellules empêche alors la mitophagie, normalement induite par Parkin, et favorise l'apoptose des neurones (Roverato *et al.*, 2021).

iii. Désordres métaboliques

L'étude des souris déficientes pour *Fat10* a mis en avant un potentiel rôle de la protéine dans la modulation du métabolisme énergétique. En effet, les adipocytes de ces souris ont une taille réduite par rapport aux souris contrôles et ont donc un **tissu adipeux blanc** moins volumineux, particulièrement le tissu adipeux épidydimal chez les mâles et peri-ovarien chez les femelles. En conséquence, ces souris ont une masse corporelle inférieure à celles des souris contrôles, tout en conservant une masse maigre similaire (Canaan *et al.*, 2014). Des préadipocytes porcins traités avec un shARN ciblant *Fat10* montrent une différenciation altérée et une diminution des gènes de l'adipogenèse et des phosphorylations d'AKT (ou PKB, Protein Kinase B), et de la voie mTOR (mechanistic Target Of Rapamycin), ce qui confirme une implication de FAT10 dans l'**adipogenèse** (C. Zhao *et al.*, 2018). De plus, la diminution de l'adiposité des souris déficientes pour *Fat10* est associée à une meilleure sensibilité à l'insuline et une meilleure tolérance au glucose suggérant un meilleur **métabolisme du glucose** chez ces souris (Canaan *et al.*, 2014).

Enfin, les souris déficientes pour *Fat10* présentent une modulation de la **dépense énergétique** puisqu'elles consomment plus d'énergie que les souris contrôles. Cette consommation accrue d'énergie est associée à une utilisation plus importante des lipides par les souris déficientes pour *Fat10* et une surexpression des gènes de la β -oxydation des acides gras dans les muscles squelettiques tels que *Ppara* (Peroxisome proliferator-activated receptor α), *Pgc1 α* (PPAR γ coactivator 1 α), *Acs1* (acyl-CoA synthetase long-chain family member 1) ou *Acox* (Acyl-CoA Oxidase). De plus, cette observation est associée à une augmentation de la lipolyse dans les adipocytes isolés des souris déficientes pour *Fat10* suggérant un **métabolisme des lipides** plus efficace chez les souris déficientes pour *Fat10* (Canaan *et al.*, 2014).

iv. Rôle dans les stéato-hépatites

Dans le foie, il est démontré que l'expression de FAT10 est augmentée lors du développement d'un HCC mais l'expression de FAT10 a aussi été étudiée dans le foie lors d'autres pathologies et en particulier lors de l'hépatite caractérisée par une inflammation du tissu hépatique. Une étude de cohorte démontre notamment que le marquage immunofluorescent spécifique de FAT10 est augmenté dans le foie des patients atteints de stéato-hépatite alcoolique (ASH) et non-alcoolique (NASH)(Jia *et al.*, 2018). Ces résultats ont par la suite été confirmés par une étude transcriptomique comparant l'expression de *FAT10* dans le foie de patients en surpoids atteints de simple stéatose comparés à des patients obèses atteints de NASH (Arendt *et al.*, 2019). Enfin, une autre étude transcriptomique confirme les résultats précédents sur une plus large cohorte composée de patients contrôles non-obèses (avec un indice de masse corporelle (IMC) inférieur à 25 ayant subi une cholécystectomie non-inflammatoire et n'ayant aucun signe histologique de stéatose) et de patients obèses morbides (IMC>40kg/ m²) ayant un foie sain (score d'activité NASH (NAS) proche de 0), une simple stéatose (NAS proche de 2, sans signe d'inflammation ou de fibrose) ou une NASH (NAS>3 avec inflammation et fibrose). L'expression génique de *FAT10* est augmentée par l'obésité dans le foie des patients, qu'ils soient sains, stéatosés ou atteints de NASH. De plus, l'expression de *FAT10* est maximale chez les patients obèses atteints de NASH et elle corrèle positivement avec la sévérité de la maladie mesurée par le NAS (Dali-Youcef *et al.*, 2019). Cependant, l'expression de l'E1-ligase impliquée dans la FATylation, UBA6, est diminuée dans les foies de patients atteints de cirrhose, d'ASH, et de NASH suggérant une diminution de la fixation covalente de FAT10 dans ces conditions (H. Liu *et al.*, 2014).

Le rôle de FAT10 dans le développement de l'hépatite, alcoolique ou non-alcoolique, n'a pas été exploré. Néanmoins, une étude intéressante de l'implication de FAT10 dans la formation d'agrégats protéiques dans le foie, les corps de Mallory-Denk (« Mallory-Denk bodies », MDB), connus pour être associés à la sévérité des dommages hépatocellulaire, a été menée. En effet, le traitement de souris sauvages avec du DDC, une molécule porphyrinogénique, induit le développement des corps de Mallory dans le foie ainsi qu'une inhibition de la dégradation protéasomale via le protéasome 26S qui est converti en immunoprotéasome. Ainsi, il a été démontré que l'expression génique de FAT10 est augmentée dans le foie des souris nourries au DDC. Cependant, l'expression des enzymes impliqués dans la FATylation, *Uba6* et *Use1*, est diminuée dans les foies de souris nourries au DDC (H. Liu *et al.*, 2014). Or, l'ajout de DDC à la nourriture de souris déficientes pour *Fat10* n'induit pas la formation des MDB ni l'inhibition du protéasome 26S ce qui signifie que Fat10 est nécessaire à la formation des MDB dans le foie (French *et al.*, 2012).

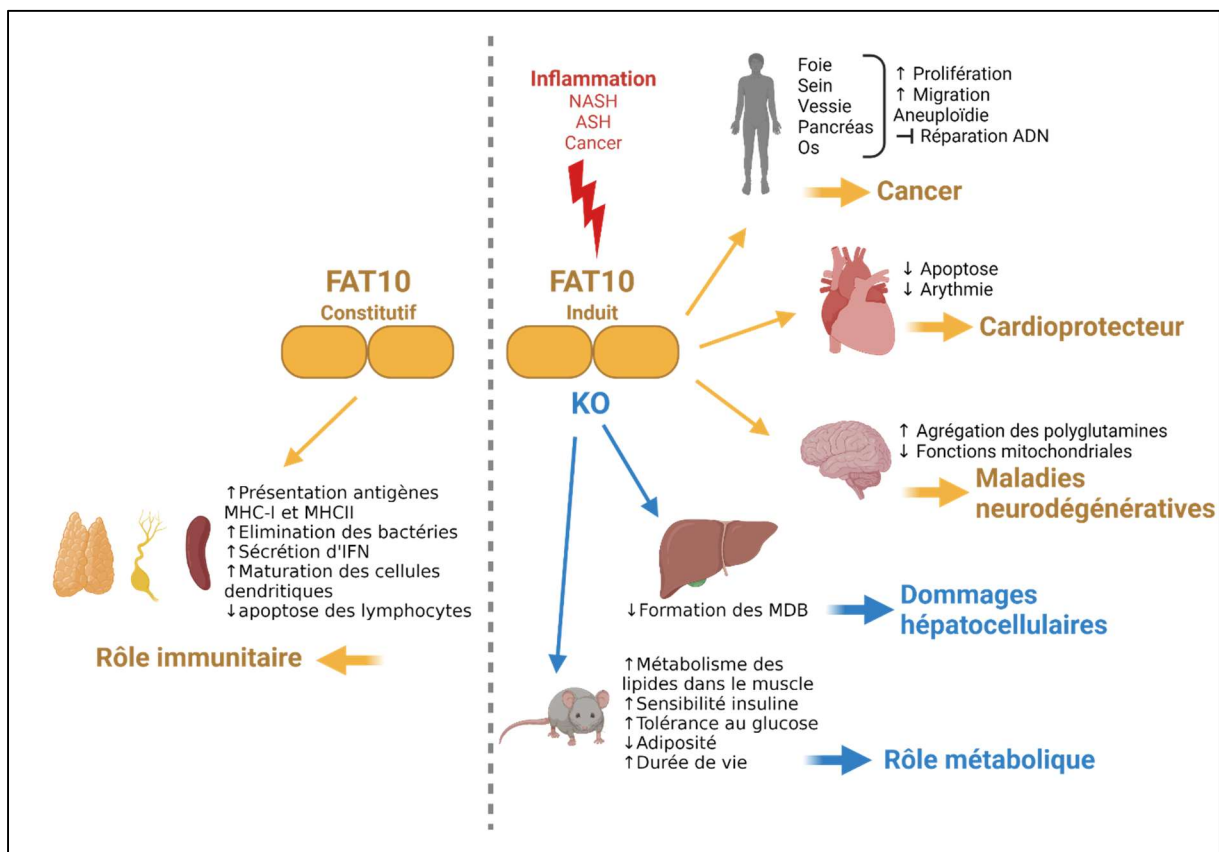


Figure 8 : Rôles physiologiques et physiopathologiques de FAT10.

L'impact physiologique de FAT10, lorsqu'il est exprimé constitutivement (à gauche) et physiopathologique, lorsqu'il est surexprimé (à droite) sont représentés dans la figure ci-dessus. Les flèches jaunes indiquent les rôles déterminés par l'étude de la surexpression de FAT10 dans les différents organes. Les flèches bleues indiquent les rôles déterminés par une déficience en Fat10 chez la souris.

Ces différents résultats montrent donc que FAT10 est surexprimé dans le **foie** dans un contexte pro-inflammatoire. De plus, FAT10 est nécessaire à la formation des MDB qui sont associés à la sévérité de pathologies hépatiques telles que la NASH. Malgré une bonne connaissance du rôle de FAT10 dans la pathogenèse de l'HCC, aucune étude n'a été conduite à ce jour pour établir le rôle de FAT10 dans les désordres métaboliques observés dans le foie tels que la NASH. Or, le foie est un organe complexe participant à des fonctions vitales de l'organisme.

Partie 2 : Le foie, organe clé du métabolisme énergétique

1) Le foie

Le foie est un organe vital, prenant place du côté droit de l'abdomen sous la cage thoracique, il est au centre de nombreux processus physiologiques chez les mammifères.

a. Anatomie macroscopique

Chez l'**humain**, le foie est majoritairement recouvert par une capsule fibreuse nommée capsule de Glisson prenant place sous le péritoine viscéral. Il est traditionnellement décrit comme divisé en deux larges lobes sur la face diaphragmatique (face lisse, en forme de dôme et épousant le diaphragme) : le lobe droit et le lobe gauche, ainsi que de deux lobes, plus petits, sur la face viscérale (face plane et épousant les replis du péritoine) : le lobe caudé et le lobe carré. Plus récemment, une division de l'organe en neuf segments prenant en compte le réseau vasculaire et biliaire a été établie (Malarkey *et al.*, 2005). Le ligament falciforme, dans la continuité de la capsule de Glisson, permet le rattachement de l'organe à la paroi abdominale (Gerber and Thung, 1987). La veine porte et l'artère hépatique sont les principaux vaisseaux qui irriguent le foie. 70% du flux sanguin hépatique est issu de la veine porte, drainant le sang provenant des veines mésentériques, gastriques et de la rate. Les 30% restant du flux proviennent de l'artère hépatique qui irrigue le foie d'un sang riche en oxygène provenant du cœur. Le sang, issu de ces deux vaisseaux, irrigue les différents lobes du foie via les sinusoides hépatiques qui aboutissent dans les veines centro-lobulaire puis le sang quitte le foie par les veines hépatiques vers la veine cave inférieure (**Fig. 9**)(Malarkey *et al.*, 2005).

Chez les **rongeurs**, et particulièrement chez la souris, le foie est de forme convexe sur le dessus au contact du diaphragme et de forme concave sur le dessous, épousant les organes abdominaux. Il est découpé en 4 lobes similaires à ceux observés chez l'humain : le lobe gauche, le lobe droit, le lobe médian et le lobe caudé. Ces lobes peuvent être subdivisés en deux lobes le lobe gauche ou droit médian et latéral, et le lobe caudal ou papillaire. Un quatrième lobe, beaucoup plus petit et peu visible est qualifié de lobe carré. Comme chez l'humain, sur la face dorsale du foie des souris, les lobes gauches médians et latéral sont fixés au diaphragme par des ligaments respectivement appelés ligament coronaire et ligament triangulaire. Sur la face ventrale, le ligament hépatorénal relie le lobe caudal au rein droit. Un ligament falciforme est aussi présent chez la souris, mais il ne remplit pas de fonction particulière et est un vestige du développement embryonnaire du foie. La vascularisation du foie de souris est similaire à celle du foie humain (Fiebig *et al.*, 2012).

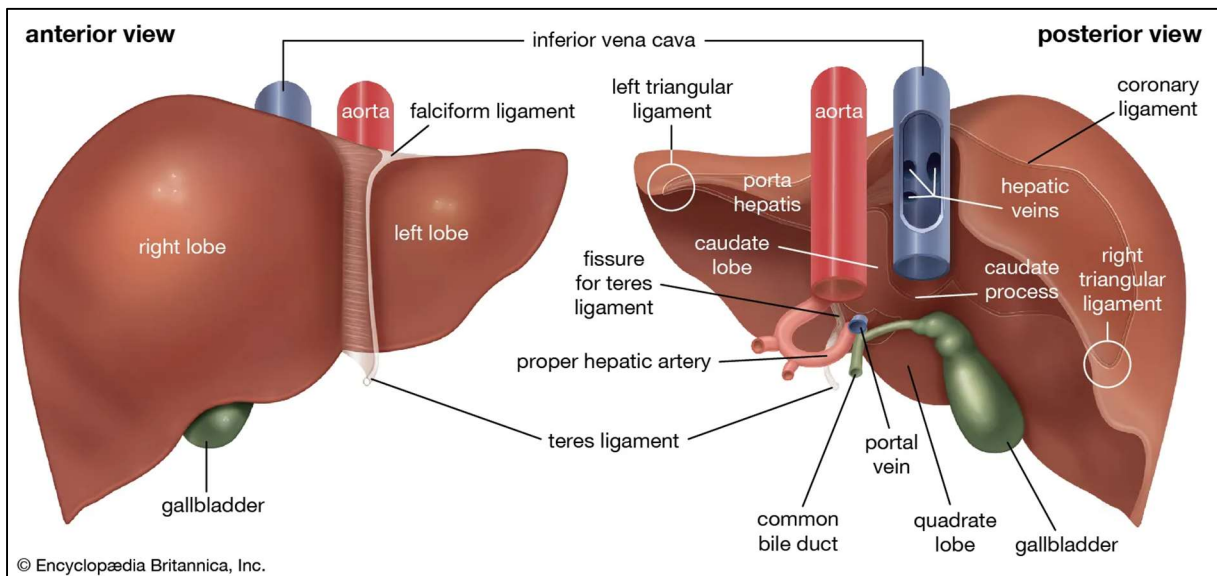


Figure 9 : Anatomie et vascularisation du foie (Encyclopædia Britannica <https://www.britannica.com/science/human-digestive-system/Gross-anatomy#/media/1/1081754/68633>).

b. Anatomie microscopique

A l'échelle microscopique, le foie est constitué d'une succession d'unités fonctionnelles composant le parenchyme hépatique. Cette organisation microscopique est comparable entre le foie humain et le foie murin.

i. Le lobule hépatique

Le lobule hépatique est la portion de forme hexagonale ayant pour centre une veine centro-lobulaire et pour sommets les rassemblements de trois vaisseaux appelés espaces portes (un canalicule biliaire, une veinule porte et une artériole hépatique). Des travées d'hépatocytes, délimitées entre elles par les sinusoides irriguant le lobule, relient le centre du lobule à ses sommets. Le lobule hépatique est l'unité qui permet de décrire à l'échelle microscopique la fonction hépatique ainsi que la vascularisation du foie (**Fig. 10 (A)**)(Rappaport AM *et al.*, 1954).

ii. Le lobule portal

Le lobule portal, de forme triangulaire, comporte à sa base un espace porte et à son sommet opposé, une veine centro-lobulaire. Il représente l'unité biliaire du foie puisque les canalicules biliaires suivent les travées d'hépatocytes de la veine centro-lobulaire vers l'espace porte (**Fig. 10 (B)**).

iii. L'acinus hépatique

L'acinus hépatique, en forme de losange, est délimité par deux veines centro-lobulaires et deux espaces portes se faisant face. Il est centré sur une branche de l'artère hépatique et il représente l'unité artérielle du foie (**Fig. 10 (C)**).

Le sang circule à travers les sinusoides hépatiques depuis les espaces portes vers les veines centro-lobulaires alors qu'au contraire, la bile circule dans les canalicules biliaires vers les espaces portes pour rejoindre les canaux biliaires (Gerber and Thung, 1987). Les sinusoides hépatiques sont les capillaires qui acheminent le sang à travers les travées d'hépatocytes et ils sont constitués d'une paroi de cellules endothéliales. Ces cellules, ainsi que l'espace qu'elles forment avec les lames d'hépatocytes (l'espace de Disse), permettent les échanges directs de grosses molécules (250kDa) (**Fig. 10 (D)**) (Braet and Wisse, 2002).

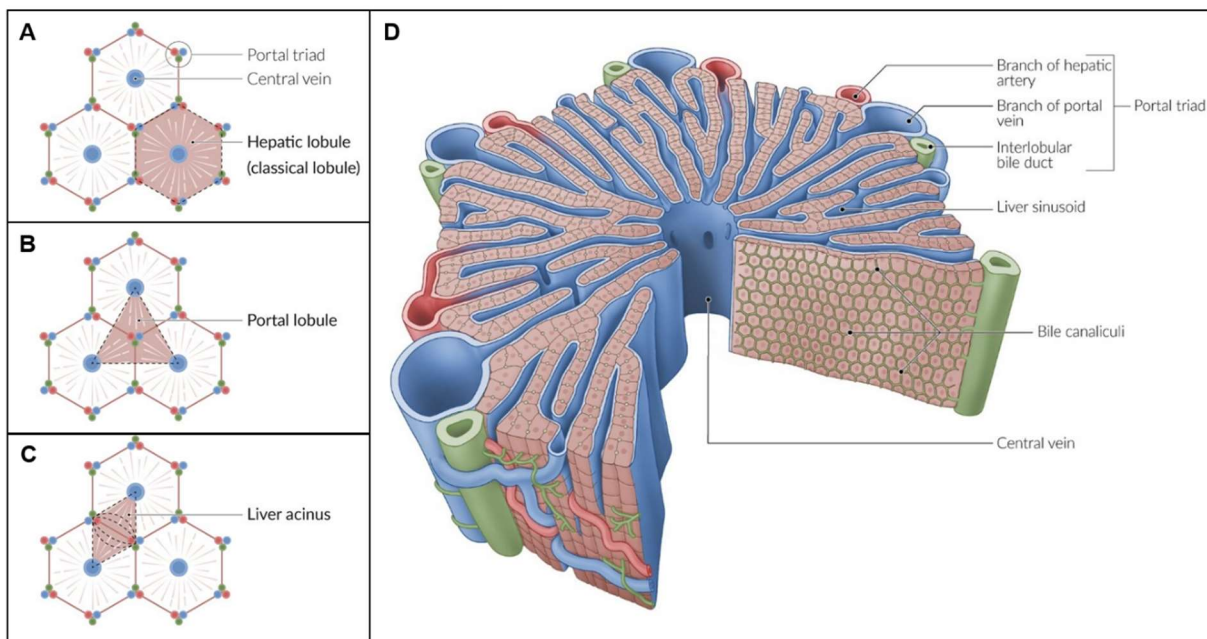


Figure 10 : Anatomie microscopique du foie (adaptée d'Amboss ; <https://www.amboss.com/us/knowledge/Liver>).

Représentations schématiques (A) d'un lobule hépatique, (B) d'un lobule portal, (C) d'un acinus hépatique. (D) Représentation détaillée d'un lobule hépatique.

c. Les cellules hépatiques

La multitude des fonctions exercées par le foie nécessite une grande diversité cellulaire et le recensement d'au moins 15 types cellulaires différents a été réalisé dans un foie normal. Les types cellulaires majoritaires sont les suivants (**Fig. 11**) :

i. Les cellules endothéliales

Les cellules endothéliales composent la paroi des capillaires sinusoides qui irriguent les lobules hépatiques. Ces capillaires se distinguent des autres capillaires de l'organisme car les cellules qui les composent présentent des pores à leur surface, elles sont alors qualifiées de « cellules fenêtrées ». D'un diamètre de 100nm, ces pores confèrent aux cellules endothéliales un rôle de barrière entre la lumière des sinusoides et l'espace de Disse et seules les particules d'une taille inférieure au diamètre des pores peuvent traverser cette barrière (Braet and Wisse, 2002).

ii. Les cellules stellaires

Dans l'espace de Disse, cité précédemment, se retrouvent les cellules stellaires hépatiques (ou cellules de Ito) qui sont des myofibroblastes spécifiques du foie. Ces cellules, représentant environ 10% de l'ensemble des cellules résidentes dans un foie normal, sont dans un état basal quiescent qui peut évoluer vers un état actif en réponse à des lésions du tissu. Physiologiquement, ces cellules participent à plusieurs processus comme le développement du tissu hépatique, le métabolisme de la vitamine A, le maintien de la matrice extracellulaire, ou la sécrétion de médiateurs tels que les facteurs de croissance. Cependant, il a été montré que l'activation de ces cellules leur permet de proliférer et leur confère des capacités de contractilité. De plus, les cellules stellaires activées produisent de la matrice extracellulaire et en particulier du collagène de type 1 associé au développement de la fibrose. Cette fibrogenèse, lorsqu'elle devient chronique, entraîne un remodelage de la matrice extra-cellulaire au sein du foie et participe au développement de maladies hépatiques telles que la cirrhose (Puche, Saiman and Friedman, 2013).

iii. Les cellules de Küpffer

Les cellules de Küpffer sont les macrophages résidents du foie et représentent 10-15% des cellules totales dans un foie sain. Elles sont présentes dans les sinusoides hépatiques, elles sont ancrées au sein de l'endothélium, et elles ont un rôle de défense immunitaire contre les pathogènes provenant de la circulation sanguine. En effet, les cellules de Küpffer expriment à leur surface des phagosomes et de nombreux récepteurs tels que les récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires (ou « Pattern recognition receptor », PRR). L'activation de ces récepteurs entraîne alors l'activation des cellules de Küpffer et conduit à leur polarisation en macrophages de type M1 ou M2 respectivement, qualifiés de classique ou alternative (Li *et al.*, 2017).

Un grand nombre de facteurs peuvent provoquer l'activation des cellules de Küpffer qui vont à leur tour se mettre à sécréter de nombreux modulateurs pro-inflammatoires comme IL1, IL6 et TNF α . Dans un premier temps, l'activation des cellules de Küpffer a été identifiée comme protectrice, mais lorsqu'elle devient chronique, elle peut être délétère. En effet, il a notamment été démontré que des souris C57Bl/6J pour lesquelles les cellules de Küpffer ont été détruites par un traitement aux liposomes de chlodronate et qui ont été nourries avec un régime déficient en méthionine et choline vont présenter une NASH moins sévère que les souris contrôles (Rivera *et al.*, 2007). Cependant, cette ablation des cellules de Küpffer dans un modèle de souris obèses suite à un régime riche en graisse induit un développement plus rapide de la stéatose hépatique (Clementi *et al.*, 2009). Ces données montrent donc que l'activation chronique des cellules de Küpffer est impliquée dans le développement des pathologies hépatiques de façon complexe (Li *et al.*, 2017).

iv. Les hépatocytes

Les hépatocytes sont les cellules les plus nombreuses du foie. En effet, elles représentent 60% des cellules hépatiques et occupent 80% du volume de l'organe. Au niveau du pôle basolatéral, les cellules sont en contact avec le sang via l'espace peri-sinusoïdal. Les membranes au niveau du pôle apical délimitent, quant à elles, les canalicules biliaires dans lesquels circule la bile sécrétée depuis les hépatocytes (Gissen and Arias, 2015).

La structure des hépatocytes est adaptée à la réalisation de fonctions métaboliques. Ces cellules sont constituées d'un large noyau central et d'un cytoplasme contenant un grand nombre d'organelles. Les réticulums endoplasmiques, lisse et granulaire, occupent 15% du cytoplasme qu'ils partagent avec environ 500 peroxyosomes et 1000 mitochondries, acteurs du métabolisme énergétique effectué par la cellule. Les hépatocytes ont aussi pour fonction principale la production de la bile (Malarkey *et al.*, 2005).

Les hépatocytes aident au maintien de l'homéostasie énergétique en participant notamment au métabolisme du glucose, des lipides, et du glycogène et ce en fonction de leur localisation dans le lobule hépatique. En effet, le sang riche en oxygène et en nutriments provenant de la triade portale s'appauvrit à mesure qu'il traverse les sinusoides jusqu'à la veine centrale. On parle de « zonation » avec d'une part, des hépatocytes péri-portaux qui sont exposés au sang enrichi et qui sont impliqués majoritairement dans la gluconéogenèse, l'oxydation des acides gras ou la synthèse de glycogène. D'autres part, les hépatocytes péri-centraux qui sont exposés au sang appauvri et impliqués dans les processus de glycolyse et de cétogenèse (Paris and Henderson, 2022).

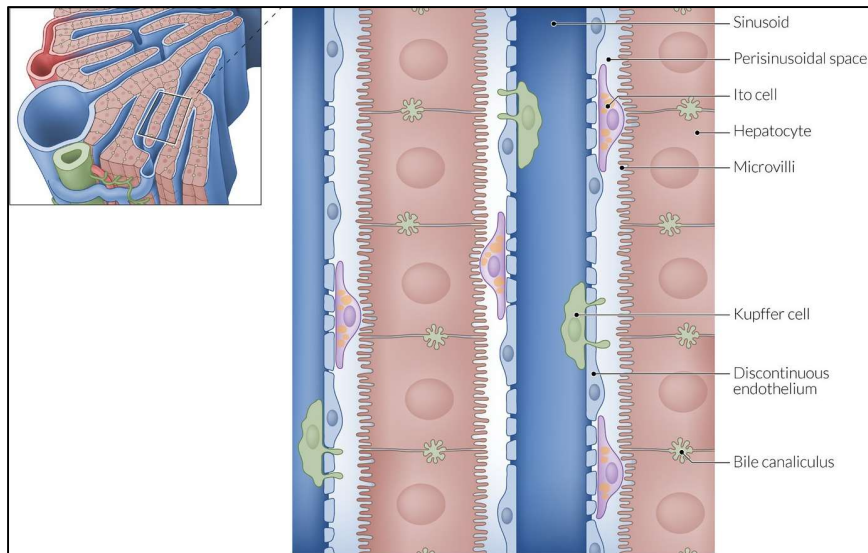


Figure 11 : Organisation cellulaire d'une sinusoié hépatique (Amboss ; <https://www.amboss.com/us/knowledge/Liver>).

2) Les fonctions hépatiques

Les fonctions portées par les cellules du foie, énoncées précédemment, vont représenter les fonctions vitales exercées par l'organe entier.

a. Fonction de détoxification

Une des fonctions principales du foie est sa fonction de détoxification des composés toxiques pour l'organisme, que ce soit des produits endogènes, issus de voies métaboliques, ou des xénobiotiques exogènes.

i. Détoxification endogène

Les hépatocytes présents dans le foie sont capables de capter l'**ammoniaque** afin de produire de l'urée par une réaction cyclique appelé « Cycle de l'ornithine ». Ce cycle catalytique fait intervenir cinq enzymes : la carbamyl phosphate synthétase et l'ornithine, toutes deux mitochondriales, puis l'arginosuccinate synthase, l'arginosuccinase et l'arginase présentes dans le cytoplasme. Cette réaction a lieu suite à la dégradation des acides aminés dans les tissus périphériques qui entraîne la formation de l'ammoniaque. Cet ammoniaque, métabolite toxique, est acheminé jusqu'au foie et entre dans le cycle de l'ornithine pour être converti en urée, moins toxique pour l'organisme, puis éliminée par voie rénale (Shambaugh, 1977).

La **bilirubine** est le produit final du catabolisme de l'hème issu de l'hémoglobine erythrocytaire, c'est un pigment biliaire de couleur jaune. La bilirubine est peu soluble dans l'eau et circule dans le sang en se conjuguant à l'albumine mais une partie de cette bilirubine peut rester sous forme libre. La bilirubine libre, liposoluble, est neurotoxique et lorsqu'elle s'accumule dans le plasma, elle est associée au développement d'encéphalopathie et d'ictère. Afin de maintenir l'équilibre entre la bilirubine soluble et insoluble, les hépatocytes captent rapidement cette bilirubine insoluble. Une fois dans la cellule, la bilirubine se conjugue à la ligandine ce qui facilite son stockage au sein de l'hépatocyte et sa glucoronoconjugaison. Ainsi conjuguée, la bilirubine devient soluble et peut être excrétée dans la bile pour être éliminée par voie intestinale ou rénale (Memon *et al.*, 2016).

ii. Détoxification exogène

La détoxification des **xénobiotiques**, que ce soit des médicaments, des composés toxiques ou des polluants, a lieu principalement dans le foie. En effet, le foie contient la majorité des enzymes de détoxification de phase I et de phase II. Les réactions de détoxification des xénobiotiques démarrent par une réaction d'oxydation catalysée par des enzymes de phase I microsomiales, comme les monooxygénase dépendantes des cytochromes P450, qui vont rendre les xénobiotiques plus hydrophiles et créer des sites de réaction pour les enzymes de phase II. Ces dernières, comme la Glutathion transférase ou les Sulfotransférases, réalisent des réactions de conjugaison. Enfin, les xénobiotiques conjugués sont captés par des récepteurs tels que les récepteurs de la famille des ATP-binding cassettes (ABC) puis éliminés via l'urine ou la bile (Croom, 2012).

b. Fonction exocrine

Comme cité précédemment, le foie est capable de produire et d'excréter la bile ce qui constitue sa seule fonction exocrine. La bile est un liquide biologique composé d'ions inorganiques, de phospholipides, de pigments biliaires, d'hormones, de protéines (en faible quantité), de cholestérol et d'acides biliaires. Elle est produite par les hépatocytes et parcourt les canalicules biliaires pour quitter le foie via les canaux biliaires. Cette voie est la principale voie d'élimination du cholestérol puisque les acides biliaires sont synthétisés à partir de ce cholestérol. De plus, les acides biliaires ont des fonctions émulsifiantes qui permettent une meilleure absorption des triglycérides, des acides gras ainsi que des vitamines liposolubles provenant de l'alimentation dans l'intestin. Chez un sujet sain, 95% de ces acides biliaires sont réabsorbés dans l'intestin et retournent dans le foie via la veine porte traduisant un cycle entre l'intestin et le foie que l'on qualifie de « cycle entéro-hépatique » (Corless and Middleton, 1983).

c. Fonctions métaboliques

i. Métabolisme des acides aminés

Le foie est l'organe principal impliqué dans le métabolisme des acides aminés et dans la production des protéines plasmatiques. Il est notamment impliqué dans la **désamination et la transamination** des acides aminés. Les enzymes impliquées dans ces processus sont l'alanine aminotransférase (ALAT) et l'aspartate aminotransférase (ASAT). Elles convertissent ensuite ces molécules en glucose ou en lipides. Ces enzymes sont libérées dans la circulation sanguine lors d'une cytolysse hépatique et servent de marqueur sanguin de souffrance hépatocellulaire. Les hépatocytes métabolisent aussi les **acides aminés non-essentiels** que sont la glutamine, le glutamate et l'aspartate. Enfin, le foie synthétise les protéines plasmatiques comme l'albumine qui est la principale protéine plasmatique mais aussi de nombreux facteurs de coagulation (Paulusma *et al.*, 2022).

ii. Métabolisme du glucose

Lors d'un apport alimentaire, les carbohydrates ingérés puis digérés passent dans la circulation sanguine sous forme, notamment, de glucose. Le foie est un organe clé dans le maintien de la glycémie puisqu'il permet de stocker l'excès de glucose sous forme de glycogène via la voie de la **glycogénogenèse**. Cette réaction met en jeu la Glycogen Synthase (GS), une enzyme elle-même activée par différentes sérine/thréonine kinases telles que la casein kinase-1, protein kinase A (PKA), et la glycogen synthase kinase-3 (GSK3).

Au contraire, à l'état de jeûne, le foie contribue à maintenir un apport glucidique pour les autres organes (cerveau, muscles...) tout d'abord via l'utilisation des stocks de glycogène qui sont libérés via la **Glycogénolyse**, une réaction dont l'enzyme limitante est la Glukokinase. Lorsque le jeûne se prolonge et que les stocks de glycogène sont épuisés, le foie est capable d'induire la synthèse de glucose *de novo* ou **Néogluco-genèse** (Han *et al.*, 2016).

d. Métabolisme des lipides

Le rôle du foie dans le métabolisme glucidique ou dans le métabolisme des acides aminés est tout aussi crucial que son rôle dans le métabolisme lipidique. Cependant, pour mieux mettre en lumière les résultats du projet de thèse énoncé dans ce manuscrit, nous détaillerons plus spécifiquement le rôle du foie dans les voies du métabolisme des lipides ainsi que dans les

déséquilibres de ces voies lors du développement des maladies du foie « gras » ou NAFLD (Non Alcoholic Fatty Liver Diseases).

i. Métabolisme post-prandial

1. Absorption des lipides

Les triglycérides (TG), les phospholipides, et les esters de cholestérol sont les lipides prédominants provenant de l'alimentation. Ces lipides, très hydrophobes, sont tout d'abord **émulsifiés** par les acides biliaires dans l'intestin ce qui en fait de meilleurs substrats pour l'**hydrolyse** par les différentes lipases présentes dans la lumière intestinale. Cette hydrolyse convertit, d'une part, les TG en monoacylglycérol et acides gras libres (FFA), et d'autre part, les phospholipides en acides gras libres et lysophospholipides. Enfin, les esters de cholestérol sont convertis en cholestérol et FFA. Une fois hydrolysés, les lipides sont **absorbés** par les entérocytes par diffusion et via des transporteurs tels que CD36 (Cluster of Differentiation 36) ou NPC1L1 (Niemann-Pick C1-Like 1). Une fois dans les entérocytes, les lipides sont réestérifiés puis stockés sous forme de chylomicrons. Ces chylomicrons, contenant le cholestérol libre et les triglycérides issus de l'alimentation, sont entourés d'une monocouche de phospholipides et d'apolipoprotéines, B48 en majorité, et entrent dans la circulation via la lymphe dans le canal thoracique (Hussain, 2014; Ko *et al.*, 2020). Une fois dans la circulation, la lipoprotéine lipase (LPL), présente sur l'endothélium vasculaire, va dégrader les chylomicrons. Les acides gras libres non-estérifiés (ou « non-esterified fatty acids », NEFA) produits lors de cette **hydrolyse** sont utilisés par les tissus comme source d'énergie alors que les particules de lipoprotéines restantes des chylomicrons (« chylomicrons remnants ») sont éliminées par le foie (Mahley *et al.*, 1984).

Les NEFA vont alors pouvoir être **captés** depuis la circulation par le foie via les protéines FATP (Fatty Acid Transport Protein), FAT (Fatty Acid Translocase), ou CD36 au sein des hépatocytes. Une fois dans les hépatocytes, les acides gras à longue chaîne (14 carbones et plus) sont activés par FABP (Fatty Acid Binding Protein) ou les ACS (Acyl-CoA Synthases). Les différents lipides sont alors répartis au sein de la cellule pour être métabolisés (Nguyen *et al.*, 2008).

2. Lipogenèse hépatique

L'organisme est capable de produire des acides gras *de novo*, notamment dans le foie, à partir du glucose provenant de l'alimentation. Cette fonction hépatique est essentielle puisqu'elle fournit les acides gras nécessaires à la production des lipides structurels. La lipogenèse *de novo* dans le foie est le fruit d'une série de réactions enzymatiques.

La première étape est la **carboxylation** de l'acetyl-CoA en malonyl-CoA par l'ACC (Acetyl-CoA Carboxylase). Il existe deux isoformes d'ACC : ACC1 et ACC2 qui vont produire du malonyl-CoA ayant

des rôles différents. Le malonyl-CoA produit par ACC1 est converti en palmitate par l'action de FASN (Fatty Acid Synthase), alors que le malonyl-CoA produit par ACC2 inhibe l'activité de CPT1 (Carnitine Palmitoyl Transferase 1), protéine impliquée dans la β -oxydation des acides gras.

FASN catalyse donc la **formation de palmitate**, seconde étape de la lipogenèse *de novo* et en est l'enzyme limitante de la voie.

Le palmitate, produit majoritaire de la lipogenèse, peut enfin être **converti en d'autres acides gras** plus complexes par des réactions d'élongation et de désaturation (Alves-Bezerra and Cohen, 2018).

La régulation de la lipogenèse *de novo* dépend fortement des **apports en carbohydrates** alimentaires. Dans un premier temps, l'entrée du glucose dans la glycolyse est une source de carbone nécessaire à la formation des acides gras. En effet, le glucose, converti en pyruvate via la glycolyse, est transformé en citrate au sein de la mitochondrie. Ce citrate est converti en Acetyl-CoA par l'action d'ACLY (ATP-citrate lyase). De plus, il a été démontré que le fructose entre également dans la lipogenèse *de novo* et la favorise (Schwarz *et al.*, 2015). Le rôle biochimique du glucose, énoncé ici, n'est pas sa seule fonction puisqu'il exerce aussi un effet transcriptionnel.

En effet, la glycémie régule l'expression des gènes impliqués dans la lipogenèse via des **facteurs de transcription**. Ce contrôle passe principalement par ChREBP (Carbohydrate Responsive Element Binding Protein) qui, après avoir été activé par des modifications post-traductionnelles en présence de glucose, transloque dans le noyau pour se lier à ses éléments de réponse et induire l'expression des gènes de la lipogenèse. L'élévation de la glycémie va aussi induire une sécrétion d'insuline et l'inhibition de la sécrétion de glucagon de la part des îlots de Langerhans présents dans le pancréas, ce qui a pour effet de réguler l'expression des gènes de la lipogenèse via SREBP-1 (Sterol Regulatory Element Binding Protein-1) (Knight *et al.*, 2005; Ameer *et al.*, 2014).

3. Synthèse des triglycérides et du cholestérol

Les acides gras ainsi formés dans le foie sont une source d'énergie qui n'est pas toujours utilisée immédiatement par la cellule. Dans ce cas, ces acides gras peuvent, d'une part, être convertis en des molécules plus complexes comme les TG ce qui permet de les stocker sous une forme inerte dans les cellules. D'autre part, ces acides gras peuvent également être utilisés pour la synthèse d'une autre sorte de lipide, le cholestérol.

Pour **stocker et exporter** les acides gras mentionnés ci-dessus, leur conversion sous forme de TG inertes est nécessaire. La majorité des TG présents dans le foie sont synthétisés par la voie du G3P (Glycerol-3-Phosphate). La première étape consiste en l'estérification d'acyl-CoA en G3P catalysée par les GPAT (G3P acyltransférases) mitochondriales et microsomales. Les produits de cette réaction sont

ensuite acylés en PA (acide phosphatidique) par les AGPAT (acylglycerol-3-phosphate acyltransférases). Le PA est alors converti par les PAP (Phosphatidate Phosphohydrolases ou Lipin) en diacylglycérol (DAG), précurseur des TG, tout comme la PC (phosphatidylcholine) et la PE (phosphatidylethanolamine). Enfin, la DGAT (DG acyltransférase) catalyse la dernière étape d'acylation des DAG en TG (Coleman and Lee, 2004; Shindou *et al.*, 2009).

La régulation de la voie de **synthèse des TG** passe par un contrôle transcriptionnel et post-transcriptionnel des enzymes présentées précédemment. Ce contrôle sera dépendant du statut nutritionnel de l'individu puisque l'insuline et le glucose vont induire notamment l'activation du facteur de transcription tel que SREBP-1 (Coleman and Lee, 2004).

Le foie est également capable de **synthétiser du cholestérol**, un important constituant des membranes cellulaires impliqué dans de nombreuses voies de signalisation. La synthèse de cholestérol hépatique représente 50% de la production totale de cholestérol par l'organisme humain. La biosynthèse du cholestérol fait intervenir plus de 20 enzymes dont la majorité sont localisées à la membrane du RE. HMGCR (3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase) est une réductase clé de ce processus. HMGCR catalyse la production de précurseur du cholestérol : le mévalonate à partir d'acetyl-CoA, ATP (Adenosine Triphosphate) et NADPH (Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate). Le mévalonate subit ensuite une cascade de réaction qui conduit à la formation de différents stérols, dont le cholestérol (Li *et al.*, 2021). La principale protéine qui régule la biosynthèse du cholestérol dans le foie est SREBP-2 puisqu'elle active la transcription d'HMGCR lorsque les concentrations en cholestérol dans la cellule diminuent (Radhakrishnan *et al.*, 2008).

4. Stockage et sécrétion des lipides

Les lipides formés dans le foie peuvent y être stockés sous forme de gouttelettes lipidiques afin d'être utilisés plus tard. Ils peuvent également être sécrétés depuis le foie vers la circulation sanguine pour fournir de l'énergie aux organes périphériques via les lipoprotéines.

- Gouttelettes lipidiques :

Les **gouttelettes lipidiques** sont les structures permettant au foie de stocker transitoirement des lipides dans les différents types cellulaires qui le composent. Les cellules stellaires contiennent des gouttelettes riches en vitamine A, alors que dans les hépatocytes, les gouttelettes sont composées d'un cœur riche en TG entouré d'une couche de phospholipides (PC) et de protéines. La formation des gouttelettes dépend de la biosynthèse de la PC réalisée par la CCT (CTP-phosphocholine cytidylyltransférase) puis leur formation, extension et maintien dépend des protéines dites « de gouttelettes ». Certaines de ces protéines interviennent dans la synthèse des lipides, comme DGAT2,

et d'autres interviennent dans la stabilisation de la structure des gouttelettes, comme PLIN2 (perilipine 2 ou ADRP) et PLIN3 (perilipine 3 ou TIP47)(Straub *et al.*, 2008; Carr and Rexford, 2016).

- **Lipoprotéines** :

Les **lipoprotéines** désignent un ensemble de micelles de différentes tailles, de différentes compositions et pouvant provenir de différents organes. Les lipoprotéines se caractérisent par une surface sous la forme d'une monocouche lipidique majoritairement composée de PC et de cholestérol. Cette surface délimite un cœur hydrophobe contenant des triglycérides, du cholestérol estérifié et des vitamines hydrophiles. Il existe trois types de lipoprotéines : les VLDL (Very low density lipoproteins), les LDL (low density lipoproteins) et les HDL (high density lipoproteins)(Heeren and Scheja, 2021).

Les **VLDL** sont riches en TG et sont produites par les hépatocytes permettant ainsi au foie d'exporter vers les muscles, les tissus adipeux et le cœur des TG comme source d'énergie. La formation des VLDL démarre par l'incorporation d'une petite quantité de TG au sein de l'ApoB100 par la MTP (Microsomal TG Transfer Protein) au niveau du lumen du RE. Par la suite, l'ApoB100 transloque à travers la membrane du RE puis s'enrichit en TG lors de son transport vers l'appareil de Golgi. Enfin, les VLDL sont sécrétées dans la circulation pour être captées dans les organes périphériques (Cohen, 2013).

Une portion de ces VLDL, appelée IDL (Intermediate Density Lipoproteins), n'est pas dégradée ni sécrétée mais est plutôt prise en charge par des enzymes telles que HL (Hepatic Lipase), CETP (Cholesterol Ester Transfer Protein) et PLPT (Phospholipid Transfer Protein). L'action de ces enzymes a pour effet d'appauvrir le contenu des IDL en TG et de les enrichir en cholestérol, elles deviennent alors des **LDL**. La fonction des LDL est donc de fournir du cholestérol aux organes périphériques via la circulation sanguine (Kobayashi *et al.*, 2015). Ces lipoprotéines jouent un rôle important dans la régulation des stérols à l'échelle de l'organisme et une concentration sanguine élevée en LDL et VLDL a été associée à une augmentation des risques de maladies cardiovasculaires (Deprince, Haas and Staels, 2020).

Enfin, les **HDL** sont les lipoprotéines qui ont pour fonction principale de réaliser le transport inverse du cholestérol depuis les organes extra-hépatiques vers le foie. En effet, l'APOA1 (apolipoprotein A1) stimule l'efflux de cholestérol à travers le transporteur ATP-dépendant ABCA1 présent sur la membrane cellulaire. Le cholestérol transite ainsi de la surface de la cellule vers la particule HDL naissante. Ensuite, APOA1 active la protéine LCAT (Lecithin-Cholesterol Acyl Transferase) favorisant la synthèse des esters de cholestérol. Ces esters de cholestérol s'accumulent dans la particule dont la taille augmente jusqu'à former une HDL mûre. Contrairement aux VLDL et LDL, une concentration circulante élevée en HDL est associée à une diminution du risque de maladies cardiovasculaires (Ouimet, Barrett and Fisher, 2019).

ii. Métabolisme pré-prandial

Au court du jeûne, la glycémie diminue et l'utilisation de glucose comme source d'énergie est restreinte. Cependant, l'organisme doit maintenir l'apport énergétique pour continuer de fonctionner et utilise les lipides comme une source d'énergie. En effet, la diminution de la concentration plasmatique en insuline favorise la lipolyse au niveau du tissu adipeux. Les acides gras ainsi libérés dans la circulation sont captés par le foie et métabolisés pour fournir de l'énergie (Rui, 2014).

1. Hydrolyse des triglycérides

L'hydrolyse des TG, ou lipolyse, est une réaction catalysée par la lipase HSL (Hormone Sensitive Lipase) qui convertit les TG en monoacylglycérol, puis par la MGL (Monoglycérides Lipase) qui convertit le monoacylglycérol et les DAG en FFA et glycérol. La lipase ATGL (Adipose Triglyceride Lipase), exprimée dans les hépatocytes et les adipocytes, est aussi capable de catalyser la première étape de l'hydrolyse en convertissant les TG en DAG. La lipolyse a pour but de fournir des FFA pour la β -oxydation mais aussi pour la formation et la sécrétion des VLDL (Quiroga and Lehner, 2012).

2. Autophagie

L'autophagie est un processus permettant de réguler, au sein de la cellule, le stockage et l'élimination de différents éléments comme les protéines, les lipides ou les carbohydrates. Plusieurs types d'autophagie existent : la macroautophagie, la CMA (« chaperonne-mediated autophagy ») et la microautophagie. La macroautophagie se caractérise par la formation d'un autophagosome autour du composé à dégrader puis cet autophagosome fusionne avec un lysosome. Les enzymes lysosomales se chargent alors de dégrader le contenu de l'autophagosome ainsi formé. La CMA repose sur la translocation directe des éléments à dégrader au travers de la membrane des lysosomes, c'est un processus de dégradation sélectif. La microautophagie, peu décrite, est réalisée par le lysosome lui-même qui internalise des constituants de la cellule par des invaginations dans sa membrane pour les dégrader (Mizushima and Komatsu, 2011).

La lipophagie est la macroautophagie par laquelle les gouttelettes lipidiques peuvent être dégradées. Ce processus est stimulé par le jeûne et conduit à la libération d'acide gras dans le cytoplasme des hépatocytes. La lipophagie n'est pas encore bien caractérisée mais elle semble être régulée par la petite protéine GTPase (Guanosine Triphosphatase) Rab7 (Ras-related protein 7) qui reconnaît les gouttelettes lipidiques et régule leur capture par les autophagosomes (Singh *et al.*, 2009).

3. Oxydation des acides gras

L'oxydation des acides gras dans le foie peut se faire par plusieurs voies différentes. La β -oxydation mitochondriale est la voie principale d'oxydation des acides gras présents dans les hépatocytes, qu'ils soient à chaînes courtes (moins de 4 carbones), intermédiaires (entre 4 et 12 carbones), ou longues (entre 12 et 20 carbones). Les acides gras à très longues chaînes (entre 20 et 26 carbones) ou à chaînes branchées entrent, quant à eux, dans la voie de β -oxydation peroxysomale. Enfin, il existe aussi les voies d' α -oxydation et de ω -oxydation se déroulant au niveau du RE et qui sont régulées par les protéines membres de la famille des cytochromes P450 4A (Alves-Bezerra and Cohen, 2018).

La **β -oxydation** est réalisée dans les mitochondries ou les peroxysomes des hépatocytes et permet de fournir l'énergie nécessaire au fonctionnement de ces cellules en condition de jeûne. L'entrée des acides gras dans la mitochondrie ou dans le peroxysome est respectivement régulée par CPT1 ou par ABCD. CPT1 α , isoforme présente dans le foie, est l'enzyme limitante de la réaction dans la mitochondrie et elle est inhibée dans la phase post-prandiale par le malonyl-CoA issu de la carboxylation de l'acetyl-CoA par ACC2 produit lors de la lipogenèse. Ensuite, chaque cycle de β -oxydation, dans la mitochondrie et dans le peroxysome, est la succession de quatre réactions : 1) désaturation de la liaison C2-C3, 2) hydratation du 2-enoyl-CoA formé, 3) déshydrogénation du 3-hydroxyacyl-CoA et 4) clivage du 3-oxoacyl-CoA. La première de ces étapes est catalysée par les ACOXs dans le peroxysome et par les ACADs (FAD-dependent Acyl-CoA Dehydrogenases) dans la mitochondrie. Les trois étapes suivantes se déroulent de façon similaire dans les deux organelles (Fransen, Lismont and Walton, 2017).

La première différence entre la β -oxydation dans la mitochondrie et celle se produisant dans le peroxysome est le substrat d'entrée. En effet, la mitochondrie prend en charge les acides gras à chaîne courte, moyenne et longue alors que le peroxysome prend en charge les acides gras à très longue chaîne et à chaîne branchée (Rui, 2014). De plus, la deuxième différence entre les deux organelles réside dans la nature du produit final de la β -oxydation. La β -oxydation peroxysomale ne permet d'obtenir que des molécules d'acyl-CoA alors que lors de la β -oxydation mitochondriale, l'oxydation des acides gras conduit aussi à la formation d'acyl-CoA qui entre dans le cycle de Krebs (ou tricarboxylic acid cycle (TCA)), qui est dégradé en H₂O et CO₂. Cette réaction s'accompagne de l'entrée de NADH et FADH₂ (Dihydroflavine-Adénine Dinucleotide) dans la chaîne respiratoire mitochondriale entraînant la production de deux molécules d'ATP. L'acétyl-CoA, n'entrant pas dans le cycle de Krebs, est alors converti en corps cétoniques : l'acétoacétate et le β -hydroxybutyrate (β -OH) qui sont sécrétés dans la circulation et qui fournissent de l'énergie aux tissus extra-hépatiques (**Fig. 12**)(Wanders, Waterham and Ferdinandusse, 2016).

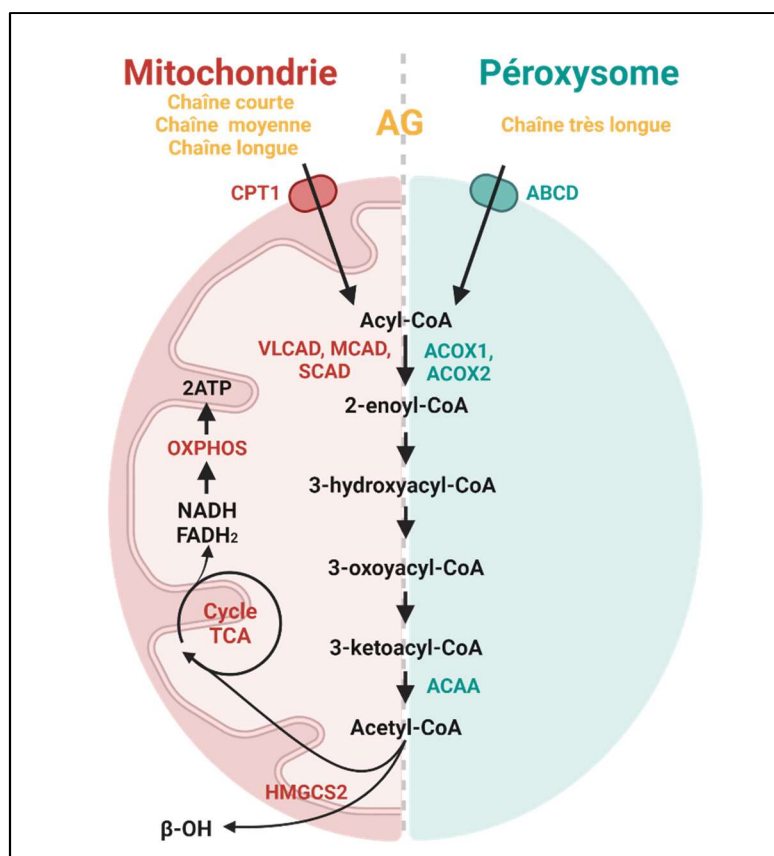


Figure 12 : β-oxydation des acides gras (adaptée de Fransen *et al.*, Mol Sci, 2017).

Le mécanisme de β-oxydation schématisé dans la mitochondrie (à gauche en rouge) et dans le peroxyosome (à droite en bleu-vert).

iii. Contrôle transcriptionnel du métabolisme des lipides

Les enzymes catalysant les voies présentées précédemment sont finement régulées pour maintenir une homéostasie énergétique. Un contrôle transcriptionnel est établi par différents acteurs dont les plus importants dans le foie sont SREBP-1 et PPARα (Nguyen *et al.*, 2008).

Le gène **SREBP** (Sterol-regulatory Element Binding Protein 1) code pour trois isoformes de protéines : SREBP-1a, SREBP-1c et SREBP-2 qui se distinguent par leur expression retrouvée dans des tissus différents ainsi que la spécificité de leurs gènes cibles. En effet, dans le foie, SREBP-1c régule les gènes de la lipogenèse *de novo* alors que SREBP-2 régule les gènes impliqués dans la synthèse du cholestérol et dans son transport. D'une part, SREBP-1c est surexprimée en présence d'insuline et, au contraire, inhibée en présence de glucagon. Son expression peut aussi être régulée par la présence d'acides gras poly-insaturés ou par le récepteur nucléaire LXR (Liver X Receptor)(Nguyen *et al.*, 2008). Ainsi, au moment de la période post-prandiale, SREBP-1c induit la transcription de FAS, SCD (Stearoyl-CoA Desaturase) ou GPAT. D'autre part SREBP-2 régule ACLY par exemple (Horton, Goldstein and Brown, 2002).

Les **PPARs** (Peroxisome Proliferator Associated Receptors) sont une famille de récepteurs nucléaires découverte en 1990 (Issemann and Green, 1990). Ces récepteurs nucléaires sont impliqués dans la régulation de la transcription de nombreux gènes ayant un rôle dans le métabolisme des lipides dans les différents tissus métaboliques. Il existe trois isotopes : PPAR β/δ , exprimé dans les hépatocytes, macrophages et adipocytes ; PPAR γ , majoritairement exprimé dans les adipocytes et, dans une moindre mesure, dans les macrophages, monocytes, cellules musculaires et cellules endothéliales ; et PPAR α , majoritairement exprimé dans les hépatocytes et les cellules du cœur. Ces récepteurs sont activés par la fixation de leurs ligands (acides gras ou fibrates), ce qui induit leur hétérodimérisation avec le partenaire RXR (Retinoid X Receptor) puis leur fixation sur leurs éléments de réponses : les PPRE (PPAR Response Elements). Cette fixation induit alors la transcription de gènes impliqués dans le métabolisme des lipides : l'activation de PPAR γ induit des gènes impliqués dans la capture des acides gras et dans la lipogenèse mais principalement dans le tissu adipeux. Dans le foie, PPAR β/δ et, de façon plus importante, PPAR α induisent l'expression des gènes impliqués dans l'oxydation et le transport des acides gras (**Fig. 13**)(Dubois *et al.*, 2017).

D'autres facteurs de transcription ont été associés au contrôle du métabolisme des lipides. En effet, **LXR** est un récepteur nucléaire activé par les oxystérols et qui régule la synthèse des acides biliaires et l'efflux de cholestérol. Il réduit ainsi l'excès de cholestérol dans la cellule (Coleman and Lee, 2004). De plus, LXR est capable d'activer SREBP-1c ainsi que FAS et ACC (Nguyen *et al.*, 2008). **FXR** (Farnesoid X Receptor) est un récepteur nucléaire activé par les acides biliaires et qui régule la formation des VLDL dans le foie ainsi que SREBP-1c ayant ainsi un contrôle sur la lipogenèse *de novo* (Bechmann *et al.*, 2012).

L'homéostasie énergétique et le métabolisme des lipides sont donc des processus finement régulés. Cependant, quand l'organisme fait face à un déséquilibre, des pathologies hépatiques peuvent alors se développer.

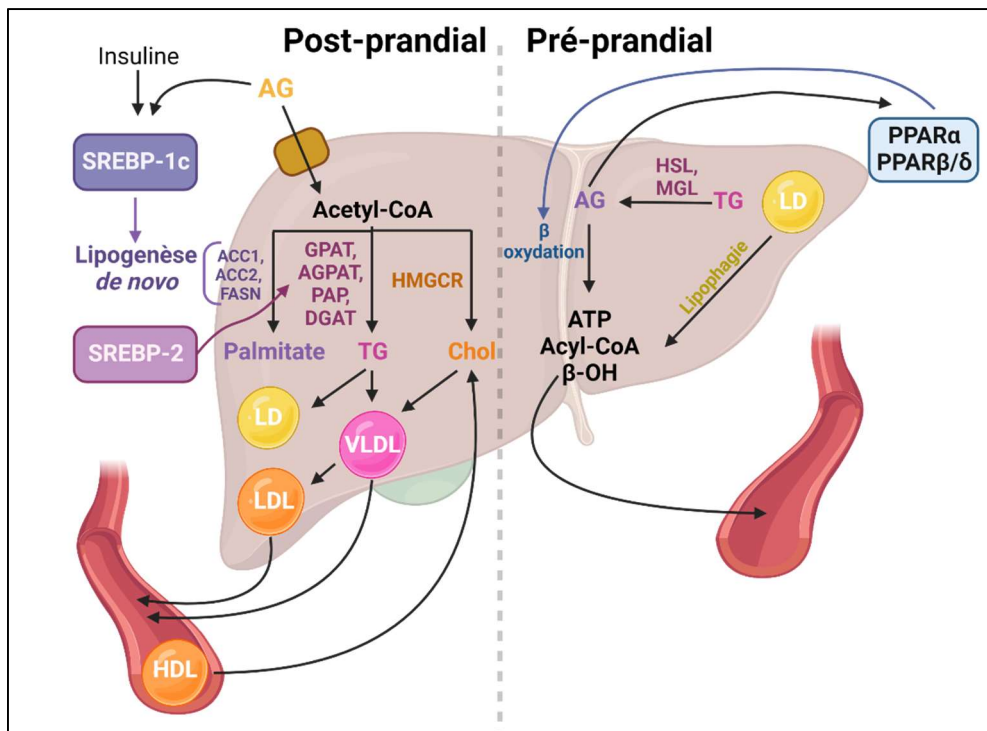


Figure 13 : Métabolisme des lipides dans le foie.

Les principaux mécanismes mis en jeu lors du métabolisme des lipides dans le foie ainsi que leur sécrétion lors de la période post-prandiale (à gauche) et pré-prandiale (à droite).

3) Altérations des fonctions hépatiques

a. Définition des NAFLD

i. Présentation générale des NAFLD

Le terme NAFLD, pour « Non-Alcoholic Fatty Liver Diseases » a été inventé en 1980 (Ludwig *et al.*, 1980) pour décrire des complications hépatiques conduisant au développement d'une cirrhose sans ingestion d'alcool. Récemment, ce terme a été remplacé par le sigle MAFLD, pour « Metabolic-Associated Fatty Liver Diseases », décrivant mieux la pathologie (Eslam *et al.*, 2020). Cependant, ce terme est controversé et n'est pas encore utilisé largement (Fouad *et al.*, 2022). Nous utiliserons donc tout au long de ce manuscrit le terme NAFLD.

Les NAFLD sont considérées comme étant les manifestations hépatiques du syndrome métabolique. En effet, la prévalence des NAFLD, et en particulier du stade agressif de NASH (Non-Alcoholic Steatohepatitis), est très élevée chez des patients obèses et présentant un diabète de type 2 (DT2). En 2018, il a été estimé que 25% de la population mondiale était atteinte de NAFLD, ce qui est en lien avec la prévalence observée en Europe, estimée entre 20 et 30% et en Amérique du Nord à 24% (**Fig. 14**). Les modes de vie actuels, alliant sédentarité et nourriture riche en sucre et graisses,

favorisent fortement le développement de la maladie et un modèle prédictif prévoit une augmentation de 178% de la prévalence des NAFLD dans le monde d'ici à 2030 (Z. Younossi *et al.*, 2019). En France, il a été estimé que 25% des plus de 15 ans présentaient une NAFLD en 2015. De plus, en 2016, il a été mesuré que 16% de ces patients étaient diagnostiqués au stade de NASH et il est prévu que ce chiffre passe à 21% d'ici 2030 (Estes *et al.*, 2018). Une des principales causes de décès des patients atteints de NAFLD est le développement de maladies cardiovasculaires, elles aussi associées au syndrome métabolique. Néanmoins, il a été montré que les patients atteints de NAFLD avec une fibrose avancée décèdent des suites de complications hépatiques (Younossi *et al.*, 2019). En plus de menacer la vie des patients, les NAFLD représentent un poids économique non-négligeable pour les sociétés actuelles. En effet, le coût annuel prédictif pour le traitement de la NASH est de 103 milliards de dollars pour les États-Unis et est voué à augmenter conformément aux données de prévalence actuelles (Marcellin and Kutala, 2018).

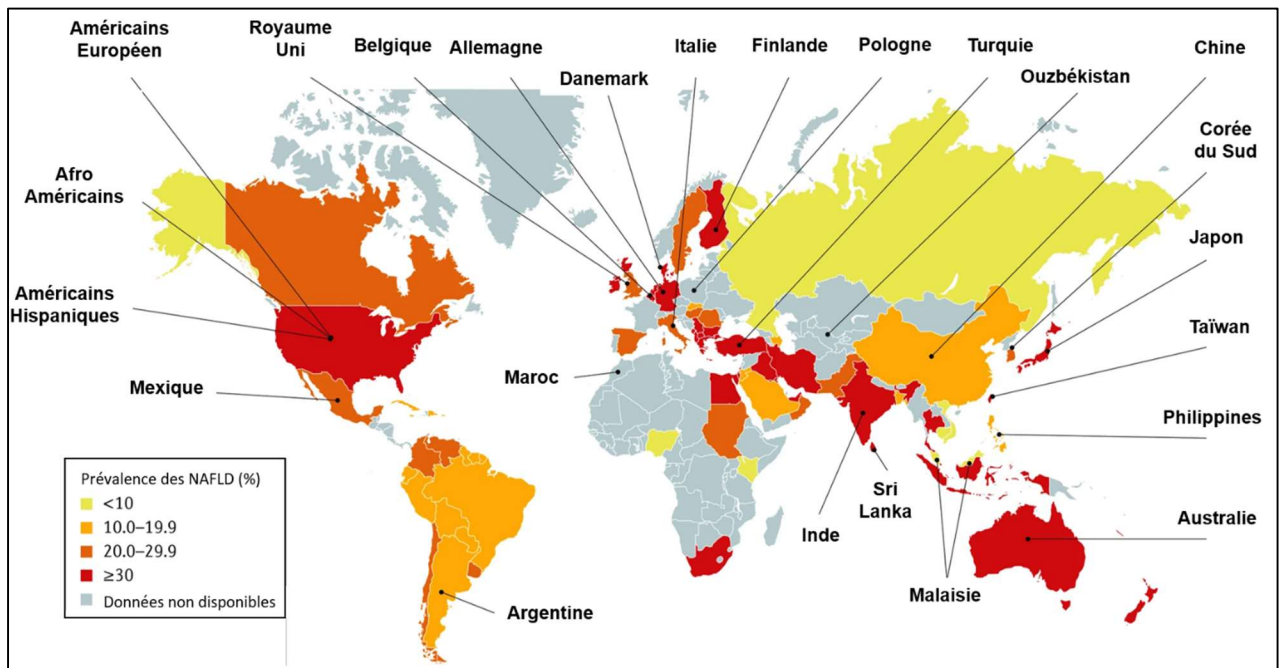


Figure 14 : Prévalence des NAFLD dans le monde (adaptée de Younossi *et al.*, 2019).

Les NAFLD se caractérisent par différents stades d'atteinte hépatique qui s'étendent de la simple stéatose à la cirrhose, en passant par l'hépatite (**Fig. 15**).

ii. Stéatose

La **stéatose**, ou Non-alcoholic Fatty Liver (NAFL) est l'accumulation de TG sous la forme de gouttelettes lipidiques dans les hépatocytes. Ce processus a pour but de stocker l'excédent de FFA

dans le foie. Ces derniers peuvent provenir de la lipogenèse *de novo* ou d'un apport extérieur, depuis le tissu adipeux, ou directement depuis l'alimentation. Ce processus est initialement protecteur car les TG sont inertes et sont stockés dans les gouttelettes lipidiques pour servir comme source d'énergie en condition de jeûne (Buzzetti, Pinzani and Tsochatzis, 2016).

Cependant, lorsque ces TG ne sont pas utilisés, ils sont stockés de façon chronique créant une lipotoxicité. Cette accumulation peut, dans un premier temps, venir d'une activation de la **lipogenèse *de novo* et de la synthèse des TG**. En effet, ces voies sont notamment régulées par ChREBP et SREBP or, ces facteurs sont eux-mêmes finement régulés par l'insuline. Cependant, dans la plupart des cas de NAFLD, les patients présentent une insulino-résistance (IR) au niveau du foie ce qui a pour effet d'induire la synthèse d'acides gras et de TG qui s'accumulent dans le foie. De plus, il a été démontré qu'un régime riche en fructose induit la lipogenèse *de novo* (Schwarz *et al.*, 2015).

Une altération de l'expression des **protéines associées aux gouttelettes lipidiques** a également été observée dans des modèles de NAFLD. Il a été démontré *in vivo* et *in vitro* sur des modèles de stéatose que les perilipines sont surexprimées et associées à une forme de stéatose chronique (Pawella *et al.*, 2014). De plus, la mutation de PNPLA3 (Patatin-like Phospholipid Domain Containing Protein 3) est fortement associée au développement de la stéatose hépatique chez l'humain (Romeo *et al.*, 2008). Les souris portant cette mutation développent une stéatose plus importante en réponse à un régime riche en sucrose que les souris sauvages (Smagris *et al.*, 2015).

Enfin, l'accumulation des gouttelettes lipidiques est aussi associée à un **défaut d'utilisation et de sécrétion des lipides**. Il a été démontré que la lipophagie est diminuée chez des sujets obèses et favorise le développement de la stéatose (Schneider, Suh and Cuervo, 2014). De plus, plusieurs études ont montré l'importance de la β -oxydation des acides gras et de l'activité mitochondriale dans le développement de la stéatose. Des souris déficientes pour le facteur de transcription Ppara (Montagner *et al.*, 2016), ou le gène *Acox* impliquées dans la β -oxydation peroxysomale (Fan *et al.*, 1996) développent spontanément une stéatose.

Cette première étape dans le développement des NAFLD constitue le premier « hit » de la maladie qui est identifié comme responsable d'un état chronique de lipotoxicité et favorisant le développement d'une inflammation hépatique.

iii. Inflammation chronique du foie

L'**inflammation** est une réponse physiologique aux dommages ou infections que le tissu peut subir et se caractérise par une sécrétion de nombreux médiateurs tels que les cytokines, chimiokines ou eicosanoïdes. Ces médiateurs régulent alors la réponse cellulaire pour mettre en place des mécanismes de défense et de réparation tissulaire. Cependant, la persistance de l'activité pro-

inflammatoire dans le tissu au cours du temps induit des changements. Ces modifications dues à l'inflammation chronique conduisent à des mécanismes de défense et de réparation aberrants qui favorisent le développement de la NASH et de la fibrose. Plusieurs facteurs vont favoriser le développement de cette inflammation chronique au sein du foie lui-même mais aussi depuis les autres organes métaboliques (Schuster *et al.*, 2018).

1. Les facteurs intra-hépatiques

Les facteurs intra-hépatiques proviennent de l'activité des cellules du foie qui influencent l'inflammation du tissu. Comme expliqué précédemment, la stéatose induit une **lipotoxicité**. L'accumulation de lipides, particulièrement d'acides-gras saturés (SFA, palmitate, stéarate), crée une cytotoxicité et favorise le stress du RE, le stress oxydant et, à terme la mort cellulaire (Krenkel and Tacke, 2017). En effet, dans ces conditions lipotoxiques, les cellules de Küpffer sécrètent des espèces réactives de l'oxygène (ROS) en grande quantité ainsi que des cytokines et chimiokines, comme IL1- β , TNF, CCL2 (Chemokine Ligand 2) ou CCL5, qui vont favoriser le recrutement d'autres cellules immunes dans le tissu. Les SFA ainsi que le cholestérol accumulés dans le foie sont aussi responsables d'une activation de l'inflammasome NLRP3 (NOD-Like Receptor family Pyrin domain containing 3) dans les cellules de Küpffer qui favorise leur activation pro-inflammatoire (Martínez-Micaelo *et al.*, 2016).

Dans le but de lutter contre l'excès de lipides dans les hépatocytes, l'oxydation des acides gras est accrue en particulier dans la **mitochondrie**. L'entrée continue de substrats dans le cycle de Krebs induit alors la formation d'une grande quantité de ROS qui vont endommager les éléments de la chaîne respiratoire mitochondriale ainsi que l'ADN mitochondrial ce qui, à terme, conduit à la mort cellulaire (Dunning *et al.*, 2009).

Enfin, les hépatocytes sont capables à leur tour de sécréter des cytokines et chimiokines que l'on qualifie d'**hépatokines**. Dans ces différentes hépatokines, on retrouve l'IL8 ou la fetuine B connue pour induire des signaux pro-inflammatoires. D'autres molécules sécrétées par les hépatocytes semblent jouer un rôle dans l'inflammation hépatique comme FGF21 (Fibroblast Growth Factor 21). Cependant, il est difficile d'étudier le rôle inflammatoire seul de ces molécules puisqu'elles jouent aussi un rôle métabolique important (Jung, Yoo and Choi, 2016).

2. Les facteurs extra-hépatiques

Les facteurs extra-hépatiques dépendent des liens du foie avec les autres organes métaboliques : le tissu adipeux et l'intestin principalement.

Le **tissu adipeux** est capable de sécréter de nombreuses hormones, cytokines, protéines de matrice extracellulaire, etc. Les éléments de ce sécrétome sont qualifiés d'adipokines. Des concentrations plasmatiques diminuées en adiponectine et élevées en leptine, deux adipokines, ont

notamment été associées à la sévérité des NAFLD. De plus, deux adipokines pro-inflammatoires : TNF α et IL6 favorisent le développement de l'IR et sont associés à la progression des NAFLD (Hui *et al.*, 2004; Wieckowska *et al.*, 2008).

Via les réseaux biliaire et sanguin, le foie est aussi en contact avec l'**intestin**. Les cellules endothéliales et le microbiote intestinal forment une barrière avec les différents pathogènes extérieurs mais cette fonction est altérée en condition d'obésité. Cette dysbiose intestinale est plus présente chez les patients atteints de NAFLD que chez les sujets sains et, dans ces conditions, le passage de pathogènes comme le LPS dans la circulation induit une inflammation de bas grade en activant les macrophages du foie en partie via TLR4 (Toll-Like Receptor 4). Les acides biliaries, permettant l'absorption des lipides, font aussi le lien entre les deux organes et sont associés au développement des NAFLD. Effectivement, il a été démontré que les patients atteints de NAFLD présentent une modification de la composition de leurs acides biliaries. Au-delà d'altérer l'absorption des lipides, ce changement de composition altère aussi la signalisation que les acides biliaries régulent via leurs récepteurs comme FXR ou TGR5 (Takeda G protein-coupled Receptor 5). Or, l'activation de ces récepteurs dans les hépatocytes protège contre le développement de la stéatose et réduit la cytolyse hépatique. Enfin, TGR5 est exprimée par les cellules immunes, dont les cellules de Küpffer, et son activation est protectrice puisqu'elle réduit la production de cytokines par ces cellules et l'inflammation de bas grade associée (Nawrot *et al.*, 2021).

La réponse inflammatoire hépatique est donc un élément moteur favorisant l'évolution de la maladie vers des stades plus graves en induisant notamment la fibrogenèse hépatique et les dommages hépatocellulaires.

iv. Souffrance hépatocellulaire

Les dommages hépatocellulaires se traduisent dans le tissu par l'apparition **d'hépatocytes ballonnés** dans le parenchyme hépatique. Ces cellules ont un aspect caractéristique avec un cytoplasme gonflé, une perte de la polarité, un noyau central, et une accumulation cytoplasmique de lipides et de phospholipides oxydés. De plus, il a été montré que ces cellules présentent une accumulation d'ubiquitine ainsi qu'une perte de cytokératine 8/18 (K8/18). Cependant, il est difficile d'étudier ces cellules qui ne sont pas facilement observables dans les modèles précliniques de NASH et le phénotype particulier de ces cellules n'est pas encore bien compris (Hirsova and Gores, 2015).

Le mécanisme à l'origine du développement de telles cellules n'est pas encore compris mais la génération d'hépatocytes *in vitro* proches de cellules ballonnées a déjà été réalisée. Ces modèles s'appuient sur l'observation selon laquelle les cellules ballonnées présentent une inhibition de la caspase 9. Ainsi, une lignée d'hépatocytes humaines, les Huh7, ont été transfectées avec un shARN

ciblant la caspase 9 puis stimulées avec des acides gras saturés (palmitate ou lysophosphatidylcholine). Les auteurs montrent que ces cellules résistent à l'apoptose lipo-induite et que le traitement avec les acides gras active la voie JNK (c-Jun-N-terminal kinase) et induit l'expression de Shh (Sonic Hedgehog). Shh est un marqueur autocrine que les auteurs associent à la survie des cellules et qui est retrouvé en grande quantité dans les cellules ballonisées identifiées sur les coupes de patients. Il est établi que l'expression ou la sécrétion de Shh peut être utilisée comme un marqueur de cellules ballonisées (Zhou *et al.*, 2020; Kusano *et al.*, 2022).

Les hépatocytes, ballonisés ou non, peuvent aussi présenter des agrégats protéiques, ou corps de Mallory-Denk, signe d'une souffrance hépatocellulaire. Ces agrégats, appelés Mallory-Denk Bodies (MDB), se caractérisent par une accumulation de protéines ubiquitinylées en particulier la K8/18 et p62 sous la forme d'une inclusion protéique.

L'étude des MDB *in vivo* et *in vitro* a permis de montrer que la formation de ces agrégats est liée à la lipotoxicité. En effet, la formation d'agrégats en réponse à un traitement au palmitate dans une lignée d'hépatocytes humains, les HepG2, a été observée et a permis de montrer que la phosphorylation de p62 par TBK1 (TANK binding kinase 1) se produit dans ces conditions et favorise la formation d'agrégats MDB-like (Cho *et al.*, 2018). *In vivo*, le modèle le plus utilisé pour l'étude de la formation des MDB est le traitement avec le DDC, une molécule porphyrinogénique. Les MDB se forment aussi spontanément au cours du vieillissement des souris déficientes pour le gène K18 ou surexprimant K8. Enfin, l'utilisation d'un régime riche en graisse chez des souris traitées avec le DDC ou surexprimant K8 potentialise l'apparition d'agrégats montrant une implication de la lipotoxicité dans la pathogenèse des MDB (Kucukoglu *et al.*, 2014).

Ces différentes manifestations de la souffrance hépatocellulaire sont le critère permettant de distinguer la simple stéatose de la stéatohépatite non-alcoolique (NASH). De tels dommages au niveau du tissu actif de façon chronique les mécanismes de réparation tissulaire via, notamment, les cellules stellaires hépatiques.

v. Fibrose

Lors de la progression des NAFLD, l'activation des cellules de Küpffer, la production de ROS et la souffrance hépatocellulaire sont autant de facteurs contribuant à l'activation des cellules hépatiques stellaires. L'activation des cellules stellaires comporte deux phases (Puche, Saiman and Friedman, 2013).

Tout d'abord, l'**initiation** qui débute par la sécrétion de facteurs pro-inflammatoires dans l'environnement des cellules stellaires par les cellules immunes présentes dans le foie. Les cellules stellaires peuvent aussi directement répondre aux stimuli pro-inflammatoires via les TLR présents à

leur surface. Lors de l'initiation, l'activation de facteurs de transcription pour les cellules stellaires stimulées vont induire l'expression des gènes impliqués dans la prolifération, la fibrogenèse, la chemoattraction ou encore la contractilité (Tsuchida and Friedman, 2017).

L'initiation est suivie de la phase de **perpétuation**, lors de laquelle les cellules stellaires actives vont agir sur leur environnement. L'activité des cellules stellaires est maintenue par l'action de signaux pro-inflammatoires et en particulier des cytokines qui sont alors qualifiées de « fibrogéniques ». Lors de l'étape de perpétuation, les cellules stellaires prolifèrent et sécrètent de la matrice extracellulaire en grande quantité, en particulier du collagène de type 1. Cet excès de matrice extracellulaire se dépose alors dans le parenchyme pour former des cicatrices fibreuses. L'accumulation de ces cicatrices fibreuses dans le foie induit un remodelage de l'architecture du tissu ce qui favorise la mort cellulaire des hépatocytes et peut conduire à la décompensation hépatique (Friedman, 2008).

Ces deux étapes peuvent être suivies d'une éventuelle troisième phase de **résolution** si les causes de la maladie sont supprimées. Dans ces conditions de résolution, les cytokines fibrogéniques ne maintiennent plus les cellules stellaires à l'état activé. Les cellules stellaires entrent alors en apoptose ou dans un état sénescence. De plus, dans des modèles de cellules stellaires activées isolées de patients alcooliques ou de foie de souris traitées avec des doses de CCl₄ (Tétrachlorure de carbone), les auteurs ont montré que les cellules activées sont capables de revenir à un état quiescent en l'absence de stimulus (Sun M, 2015).

b. Evolution des NAFLD

Comprendre l'évolution de la maladie est crucial pour la diagnostiquer et la traiter efficacement et deux principales voies de progression ont été observées : une voie non-progressive et une voie d'évolution rapide.

En effet, certains patients présentant une stéatose vont rester à ce stade pendant plusieurs années et **évoluer très lentement** vers le stade de NASH. Initialement, ce stade de stéatose était considéré comme bénin mais, de récentes études ont montré que certains patients ayant seulement une stéatose peuvent développer une fibrose avancée au cours de leur suivi, phénomène observé plus couramment chez des patients initialement diagnostiqués avec une NASH. Cependant, le risque pour ces « slow progressors » d'évoluer vers un stade de fibrose avancée est faible. Ces observations soulignent les différences inter-individuelles des patients atteints de NAFLD (McPherson *et al.*, 2015).

D'autre part, certains patients **évoluent très rapidement** du stade de stéatose vers les stades de NASH et de fibrose avancée. Ces « fast progressors » ne sont souvent diagnostiqués qu'au stade de fibrose avancée qui est le facteur de risque important pour la mortalité des suites des NAFLD. La fibrose avancée est aussi un facteur de risque important dans le développement des maladies

cardiovasculaires qui sont une des principales causes de décès chez les patients atteints de NAFLD (Pais *et al.*, 2013).

c. Diagnostic

Tous les processus évoqués précédemment décrivant le spectre des NAFLD sont des processus évolutifs étroitement reliés les uns aux autres. De plus, l'évolution d'un stade à l'autre de la maladie est dépendante de chaque individu faisant des NAFLD une maladie évolutive complexe et difficile à diagnostiquer.

Le **diagnostic** des patients atteints de NAFLD est souvent tardif car les patients atteints ne présentent généralement pas de symptômes aux phases précoces. Actuellement, il n'y a pas de dépistage universel de ces maladies à cause des méthodes de diagnostic coûteuses et invasives. Cependant, de récentes mesures Européennes recommandent le dépistage des patients à risque (IMC>30 kg/m²) via des ultrasons et/ou des mesures des enzymes hépatiques plasmatiques. Pour les patients à risque et/ou présentant des concentrations en enzymes hépatiques trop élevées, la recherche d'une stéatose est réalisée via des ultrasons. Si une stéatose est avérée, les patients subissent une biopsie hépatique dans le but de confirmer la stéatose et de déterminer ou non la présence des différents paramètres de la NASH : inflammation, ballonnisation et fibrose (Chalasanani *et al.*, 2018).

Pour mieux quantifier ces différents paramètres, des scores ont été créés, notamment le « **NASH-activity Score** » (NAS). Ce score est la somme des scores de stéatose, d'inflammation et de ballonnisation déterminés à partir de l'observation de coupes obtenues à partir d'une biopsie hépatique incluse en paraffine. Ces coupes sont marquées avec de l'hématoxyline, colorant en bleu les acides nucléiques présents dans les noyaux cellulaires, et de l'éosine, colorant en rose les éléments du cytoplasme. Les coupes sont aussi marquées avec du trichrome de Masson, colorant en bleu les noyaux, en vert les fibres de collagène et en rouge le cytoplasme. La macro-stéatose est alors identifiée au niveau des cercles blancs observables sur la coupe, si elle couvre une surface inférieure à 5% du champ observé, un score de stéatose de 0 est attribué, si elle couvre entre 5 et 33%, un score de 1, entre 33 et 66% un score de 2 et enfin si la surface couverte par la stéatose est supérieure à 66%, un score de 3 est attribué. L'inflammation sera évaluée en dénombrant le nombre de foyers inflammatoires présents sur le champ observé à la magnification 200X. Si aucun foyer n'est aperçu, le score d'inflammation est de 0, si moins de 2 foyers sont observés, le score est de 1, s'il y a entre 2 et 4 foyers, le score est de 2 et enfin, au-delà de 4 foyers le score est de 3. Enfin, les cellules ballonisées sont détectées grâce à leur aspect particulier et un score de ballonnisation 0 est attribué quand il n'y en a aucune, un score de 1 quand il y en a quelques-unes et un score de 2 quand le nombre de cellules

ballonnées est conséquent. L'obtention du NAS se fait en additionnant les scores précédents et on considère que les patients ne sont pas atteints de NASH si $NAS < 2$ et sont atteints de NASH si $NAS \geq 5$. Les patients avec $2 \leq NAS < 5$ sont dans « la zone grise » qui ne permet pas de conclure quant au diagnostic (**Fig. 15**)(Kleiner *et al.*, 2005).

Il existe des **critères d'exclusion** qu'il faut prendre en compte pour catégoriser les patients atteints de NAFLD. En effet, les patients présentant une hépatite virale, une maladie particulière (maladie de Wilson, maladie cœliaque ou hémochromatose), une anomalie métabolique indépendante (maladies du stockage des esters de cholestérol ou du glycérol, syndrome de Reye...), une grossesse, consommant de l'alcool (>30 g d'alcool pour un homme et >20 g d'alcool pour une femme par jour) ou des drogues ne peuvent pas être considérés comme des patients atteints de NAFLD (Papatheodoridi and Cholongitas, 2019).

Le calcul du NAS, présenté ci-dessus comporte des **limites**. En effet, ce score ne prend pas en compte la fibrose qui fait partie de la physiopathologie de la NASH. Pour pallier cette limite, un autre score a été mis en place : le « **Steatosis Activity and Fibrosis** » (**SAF**) score, qui inclus la fibrose dans le calcul du score final. Cependant, le NAS reste plus largement utilisé en clinique. Une autre limite de la technique de diagnostic par l'histologie est la variabilité induite par les observateurs. En effet, les analyses de champs de coupes sont réalisées par des anatomopathologistes dont la vision est subjective en particulier lorsqu'il s'agit d'identifier les cellules ballonnées. Des algorithmes sont en cours de développement afin de standardiser cette procédure et réduire la variabilité inter-observateur. L'algorithme FLIP (Fatty Liver Inhibition of Progression) a notamment été développé dans le cadre de cette démarche (Bedossa *et al.*, 2014). Enfin, l'invasivité de la biopsie hépatique la rend difficile à appliquer au plus grand nombre. De ce fait, de nombreuses recherches sont menées actuellement pour identifier des méthodes de détection de la NASH non-invasives. L'accent a notamment été mis sur l'étude de biomarqueurs sanguins pouvant indiquer la présence d'une NASH. La cytokératine 8/18 circulante fait partie de ces biomarqueurs et elle a été validée sur plusieurs études de cohortes humaines (Younossi *et al.*, 2008; Cusi *et al.*, 2014).

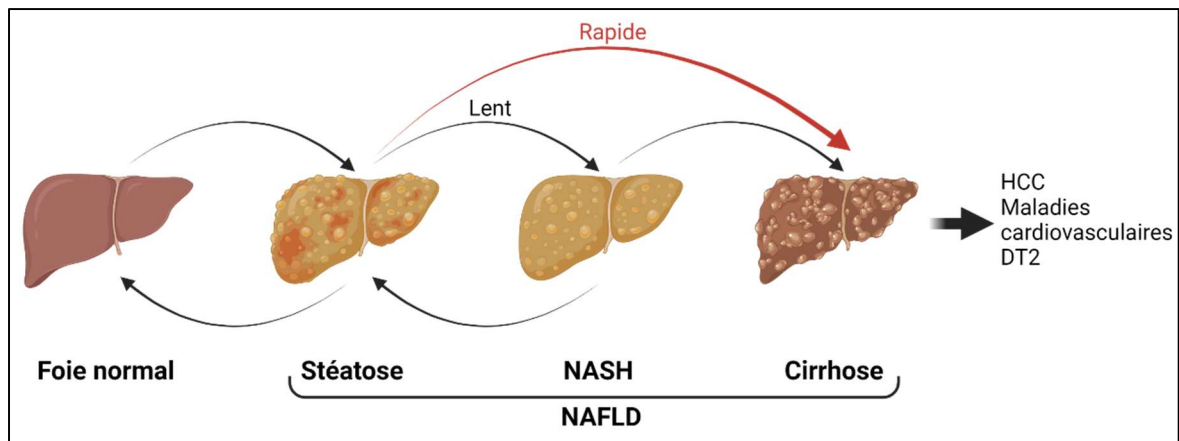


Figure 15 : Progression des NAFLD (adaptée de Haas and Staels, 2016)

d. Étiologie de la maladie

Les causes à l'origine du développement des NAFLD ne sont pas encore toutes comprises. Cependant, de nombreux facteurs de risques favorisant la progression de ces maladies ont été identifiés. Ces facteurs de risques sont génétiques, épigénétiques, environnementaux et font intervenir les organes extra-hépatiques ce qui fait des NAFLD des maladies multifactorielles (Fig. 16).

i. Facteurs génétiques

Des variants génétiques ont été associés au développement des NAFLD. Les variants observés le plus fréquemment concernent les gènes *PNPLA3*, *HSD17B13* (17- β Hydroxysteroid Dehydrogenase 13), *TM6SF2* (Transmembrane 6 Superfamily 2 Human gene), *GCKR* (Glucokinase Regulatory Protein) et *MBOAT7* (Membrane Bound O-Acyltransferase Domain Containing 7).

Certaines de ces mutations sont associées aux phases précoces des NAFLD comme sur le gène *PNPLA3*, codant pour la patatin-like phospholipase containing domain 3, une variation anti-sens est observée sur la séquence I148M. Cette variation a pour effet d'altérer la fonction de la phospholipase et de réduire la lipolyse et est ainsi associée au développement de la stéatose chez les patients qui la portent (Romeo *et al.*, 2008). De plus, la mutation sur la séquence P446L du gène *GCKR*, codant pour la glucokinase regulatory protein, a été identifiée dans le foie des patients atteints de NASH. Cette mutation a notamment été associée à une capacité réduite de la protéine à inhiber la glucokinase ce qui influence le métabolisme hépatique du glucose. Ce défaut dans le métabolisme du glucose va moduler le métabolisme des lipides via la glycolyse et le malonyl-CoA ce qui conduit à une inhibition de la β -oxydation et favoriser le stockage hépatique de lipides. Sur le gène *HSD17B13*, l'insertion d'une adénine est observée pour le variant d'épissage rs72613567. Cette mutation induit une perte de

fonction pour la protéine codée par ce gène, la protéine de gouttelette lipidique hydroxysteroid 17- β -dehydrogenase 13, ce qui a pour effet de favoriser l'accumulation des sphingolipides. Cette mutation, contrairement à celle portée par PNPLA3, est protectrice contre la stéatose, l'inflammation, la fibrose et la ballonnisation (Jonas and Schürmann, 2021).

D'autres mutations vont être associées aux phases plus tardives de la NASH et au développement de la fibrose. En effet, le gène **MBOAT7**, codant pour la membrane-bound O-acyltransferase domain-containing 7, a été identifié comme impliqué dans le développement de la fibrose. La protéine codée par ce gène appartient à la famille des acyl-transférases de lysophospholipides. Des mutations de **MBOAT7** ont été associées à une augmentation du phosphatidylinositol et du lysophosphatidylinositol ainsi qu'au développement de la fibrose et de dommages hépatiques. Enfin, le variant E167K du gène **TM6SF2**, codant pour la transmembrane 6 superfamily member 2, a été associé à une accumulation de TG hépatiques ainsi qu'à un plus fort risque de développer une fibrose avancée (Liu *et al.*, 2014). Il a été montré que cette mutation inhibe la sécrétion des TG depuis le foie en bloquant la formation de VLDL (Mahdessian *et al.*, 2014).

Enfin, d'autres mutations génétiques plus rares ont été associées au développement des NAFLD comme sur les gènes **PPP1R3B** (Protein Phosphatase 1 Regulatory Subunit 3B), **IRGM** (Immunity-Related GTPase family M protein) ou **LPIN** (Lipin)(Jonas and Schürmann, 2021).

ii. Facteurs épigénétiques

Au-delà des mutations présentées ci-dessus, les gènes impliqués dans le métabolisme des lipides peuvent aussi subir des modifications épigénétiques qui sont associées au développement des NAFLD.

Il a notamment été démontré que des **défauts de méthylation** de l'ADN étaient observés chez des patients atteints de NAFLD. Une hypométhylation est observée chez les patients malades, en particulier sur des gènes impliqués dans la réparation tissulaire. Dans ces conditions, la méthylation ne réprime pas la transcription des gènes de la réparation tissulaire qui vont être surexprimés et qui vont induire une fibrose dans le tissu (Murphy *et al.*, 2013). De plus, il a été démontré que la méthylation de sites CpGs présents sur les facteurs de transcription anti-fibrotiques, tels que PPAR α et PPAR β/δ , est augmentée pour les patients atteints de NAFLD. Cette augmentation de la méthylation est d'autant plus importante chez les patients atteints d'une fibrose avancée. Au contraire, chez ces patients, des gènes pro-fibrotiques tels que TGF β (Transforming Growth Factor β) ou PDGF α (Platelet Derived Growth Factor α) présentent une augmentation de la méthylation (Zeybel *et al.*, 2015).

Les **micro-ARNs** (miRNAs), ces simples brins d'acides ribonucléiques non-codants, régulent aussi des gènes de façon épigénétique puisqu'ils répriment la traduction et module la stabilité des ARN

messagers en interférant avec ces derniers. Certains de ces miRNAs ont été associés au développement des NAFLD comme miR-122, miR-192, miR-34 et miR-33 a/ b.

MiR-122 et miR-192, dont les expressions géniques sont diminuées dans les foies des patients atteints de NAFLD, jouent un rôle important dans la régulation transcriptionnelle d'acteurs du métabolisme comme PPAR α , ChREBP ou PPAR γ (Latorre *et al.*, 2017). De façon intéressante, l'expression de ces miRNAs est augmentée dans le plasma des patients atteints de NAFLD ce qui suggère une sécrétion accrue (Pirola *et al.*, 2015). **MiR-34** est, quant à lui, augmenté dans les foies des patients atteints de NAFLD et il a été démontré que cette surexpression est associée à une inhibition de la lipophagie via l'inhibition d'ATG4B et de Rab-8b (Kim *et al.*, 2021). **MiR-33a et b** sont deux miRNAs qui ne diffèrent que de deux nucléotides et qui sont placés sur des introns de SREBP-1 et SREBP-2. Ils sont surexprimés chez les patients atteints de NAFLD et sont associés à la régulation de gènes impliqués dans la synthèse des acides gras. De plus, les souris déficientes pour miR-33a présentent une augmentation de la production de HDL et de leur sécrétion depuis le foie (Horie *et al.*, 2010).

Les **histones** peuvent aussi être modifiées par des mécanismes tels que l'acétylation via les acétyltransférases (HAT) qui peuvent être réversibles par l'action des déacétylases d'histones (HDAC). Ces mécanismes de modification sont perturbés lors de la pathogenèse des NAFLD. En effet, les HDAC ont notamment été identifiées pour jouer un rôle important dans le développement des NAFLD. Il a, par exemple, été démontré que la délétion d'HDAC3 induit une stéatose hépatique. Cette protéine colocalise avec le corépresseur NCoR1 (Nuclear Receptor CoRepressor 1) au voisinage de gènes impliqués dans le métabolisme des lipides. De plus, les auteurs démontrent que ce mécanisme favorise l'entrée des métabolites dans la voie de la gluconéogenèse plutôt que dans la synthèse des lipides ce qui prévient ainsi la stéatose (Sun *et al.*, 2012).

iii. Facteurs environnementaux

Comme énoncé précédemment, les NAFLD sont des maladies multifactorielles dans lesquelles l'environnement des patients est un facteur de risque important. En effet, l'alimentation ou la pollution sont des pressions environnementales qui peuvent favoriser le développement des NAFLD.

1. Alimentation

Tout d'abord, l'obésité est un facteur de risque majeur dans le développement des maladies métaboliques et en particulier des NAFLD. L'organisation Mondiale de la Santé (OMS) a déterminé que les individus ayant un IMC ≥ 30 kg/m² présentent une obésité et donc un risque accru de développer des maladies métaboliques (Younossi, 2019). Cette masse corporelle élevée peut être due à des apports caloriques trop importants ou inadapés mais aussi à une activité physique réduite.

En effet, pour un individu, des régimes **trop riches** en graisses ou en sucre et excédant l'apport journalier en énergie favorisent le développement de la stéatose. De plus, il a été démontré que la fréquence à laquelle les individus s'alimentent a une incidence sur la stéatose. Par exemple, le grignotage a été identifié comme un facteur d'aggravation de la stéatose indépendant (Koopman *et al.*, 2014). Les **SFA**, présents notamment dans les graisses animales, sont également associés au développement de la stéatose ainsi qu'à une augmentation de l'IR hépatique. Les sucres ajoutés, notamment le **sucrose et le fructose**, très présents dans les boissons de type soda, contribuent aussi au développement de la stéatose. En effet, ces sucres stimulent la synthèse des TG hépatiques via la lipogenèse *de novo*. De plus, le fructose altère la perméabilité intestinale ce qui favorise le passage de pathogènes et, par conséquent, l'inflammation hépatique. Enfin, les boissons de type cola contiennent des colorants « caramels » obtenus à partir d'**AGEs** (advanced glycation end products), impliqués dans l'IR, et qui exacerbent la NASH et la fibrose hépatique. En association avec ces facteurs liés à l'alimentation, le développement d'une obésité est aussi dû à la **sédentarité**. En effet, il est démontré que le temps passé en station assise est associé au développement des NAFLD (Romero-Gómez, Zelber-Sagi and Trenell, 2017).

2. Pollution

Dans les sociétés actuelles, l'exposition à la pollution est quotidienne et certains polluants, qu'ils soient présents dans l'air, dans l'eau ou dans la nourriture, sont associés au développement des NAFLD.

Parmi ces polluants se retrouvent les **métaux lourds** présents dans les sols, les plantes et même dans l'organisme de certains animaux consommés dans le cadre d'une alimentation omnivore. L'arsenic, par exemple, potentialise les effets d'un régime riche en graisse au niveau de la stéatose hépatique. Il existe une association positive entre la concentration d'arsenic retrouvée dans les urines des patients et leur diagnostic de NAFL. Les **pesticides/ insecticides**, tels que le Fipronil, sont connus pour être associés au développement des NAFLD chez l'humain. En effet, leur ingestion favorise la peroxydation des lipides et induit un stress oxydant dans le tissu hépatique. Enfin, les différents **polluants de l'air** issus de la combustion d'énergie fossile produisent des micros et des nanos particules qui peuvent être inhalées par les sujets puis se retrouver dans le foie via la circulation sanguine. Des études montrent que l'inhalation de ces particules chez la souris promeut le développement de la stéatose hépatique ainsi que l'inflammation (Rajak *et al.*, 2021).

iv. Maladie multifactorielle

Il est maintenant établi que les NAFLD ne sont pas des maladies qui se limitent au foie et qu'elles sont associées au développement de complications extra-hépatiques telles que les maladies cardiovasculaires et le DT2. En effet, les mécanismes physiopathologiques de ces différentes maladies sont intimement liés.

Les **maladies cardiovasculaires** (CVD) constituent un problème de santé public touchant le monde entier avec environ 17,9 millions de morts par an dans le monde. Il a été démontré que les patients atteints de NAFLD présentent un risque important de développer une CVD, en particulier une athérosclérose. Ces études démontrent que la sévérité de la maladie est fortement associée à l'incidence de CVD en particulier la sévérité du paramètre de fibrose. Enfin, une récente étude s'intéressant aux causes de décès de patients atteints de NAFLD aux États-Unis de 2007 à 2016 a montré que les CVD sont la deuxième cause de décès de ces patients. Les risques cardiovasculaires sont d'autant plus importants pour les patients atteints de **DT2**. En effet, ces patients ont une plus forte probabilité de développer des formes avancées de NAFLD ainsi que les complications métaboliques associées telles que l'hypertension, la dyslipidémie ou la cirrhose (Caussy, Aubin and Loomba, 2021).

Certains mécanismes à l'origine du développement du DT2 sont similaires à ceux initiant les NAFLD ou les CVD. Ces **mécanismes communs** comprennent notamment la dyslipidémie, la production de facteurs pro-thrombotiques, l'hyperglycémie résultant de l'IR, l'inflammation de bas grade et l'altération du microbiote intestinal (Caussy, Aubin and Loomba, 2021).

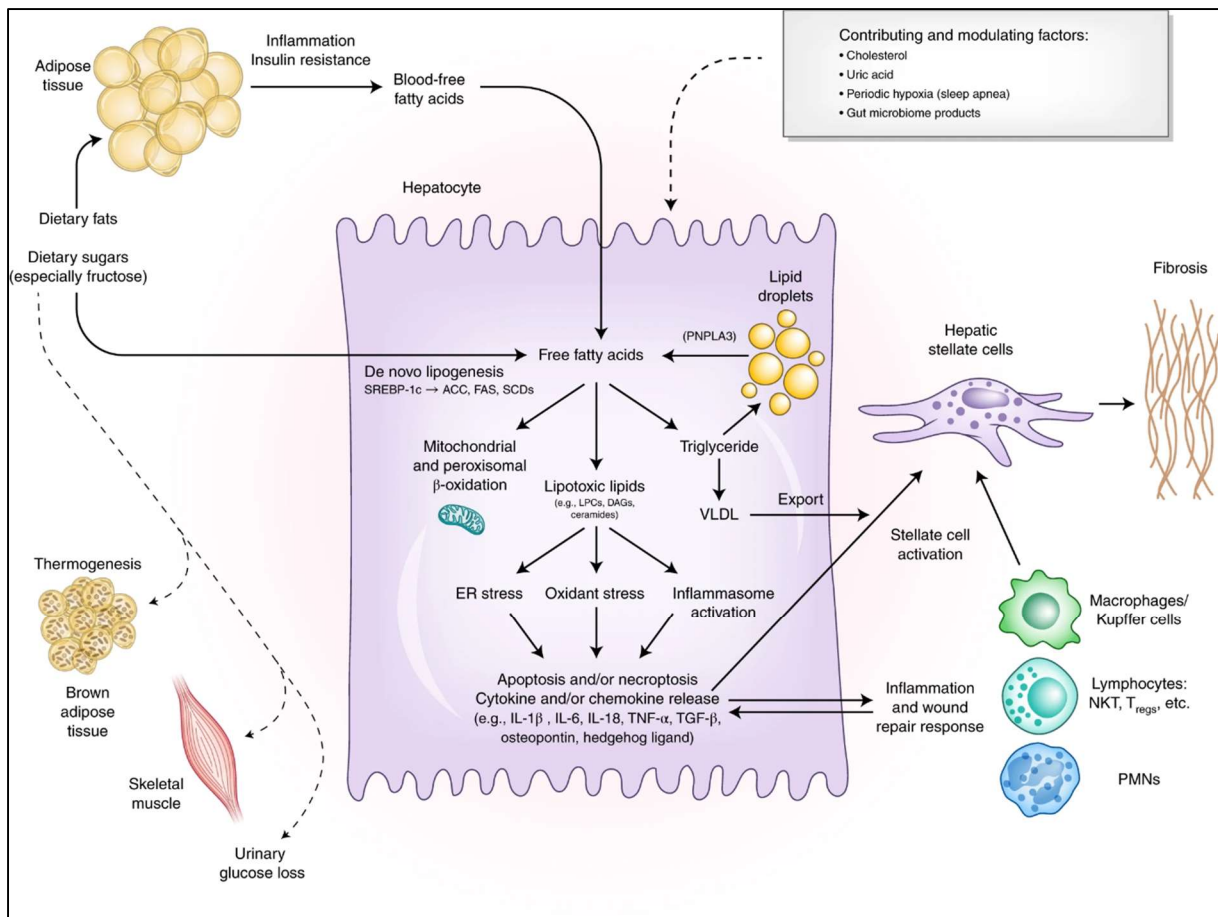


Figure 16 : Principaux mécanismes moléculaires conduisant au développement de la NASH (Friedman *et al.*, 2018).

e. Modèles d'étude de la NASH et des NAFLD

L'étude de pathologies aussi complexes que les NAFLD n'est pas une chose aisée et aucun modèle n'arrive, à ce jour, à décrire tous les paramètres et facteurs présentés ci-dessus. Cependant, une myriade d'outils a été développée pour mieux comprendre la pathogenèse des NAFLD que ce soit *in vivo* ou *in vitro*.

i. *In vivo*

L'importante contribution de tous les organes métaboliques dans le développement des NAFLD est un critère majeur qui rend l'utilisation de modèles *in vivo* essentielle dans l'étude de cette pathologie. Cependant, le modèle animal parfait pour étudier les NAFLD n'existe pas et les choix du modèle à utiliser dépendent grandement des questions auxquelles le modèle en question veut répondre. Les deux principales façons de créer des modèles de NAFLD *in vivo* reviennent à modifier soit le régime alimentaire soit le code génétique de l'animal. Nous nous concentrerons par la suite sur

les modèles murins, mais il est à noter que des modèles de NAFLD sont développés sur d'autres espèces comme les rats, ou les porcs.

1. Régimes alimentaires et produits chimiques

Plusieurs régimes ont pu être développés aux cours du temps dans le but de reproduire les différents aspects des NAFLD chez les rongeurs.

Les régimes contenant 10% de graisses et **déficients en choline et en méthionine** sont des régimes qui permettent de développer rapidement la stéatose hépatique macro-vésiculaire. En effet, la méthionine et la choline sont essentielles à la formation des VLDL permettant la sécrétion des lipides depuis le foie. En leur absence, les lipides s'accumulent dans le foie et favorisent le développement d'une inflammation et d'une fibrose au cours du temps. Les limites de ce modèle résident dans le fait que, malgré le développement de tous les paramètres de NASH, les souris ne présentent pas d'IR ni d'obésité, au contraire, elles ont plus tendance à perdre du poids, or, obésité et IR sont deux facteurs fortement associés à la pathogenèse de la NASH (Itagaki *et al.*, 2013).

Le régime semi-synthétique « Choline-deficient L-amino acids-defined » (**CDAA**) est similaire au régime MCD puisqu'il se caractérise également par une déficience en choline. Cependant, les protéines de ce régime sont substituées par des acides aminés L. Ainsi, les souris nourries avec ce régime développent la NASH d'une façon comparable aux souris nourries avec un MCD mais la perte de poids observée en réponse au régime est moins importante avec le régime CDAA qu'avec le régime MCD. Au bout de quelques semaines d'exposition au CDAA, les souris présentent donc une NASH mais c'est à partir de 22 semaines d'exposition que les souris commencent à prendre du poids et présentent une augmentation des concentrations circulantes en TG et cholestérol suggérant une IR (Miura *et al.*, 2010).

Les régimes **riches en graisses**, composés de 71% de graisses, de 11% de carbohydrates et de 18% de protéines, sont les régimes reproduisant le mieux les apports alimentaires d'un individu des pays occidentaux. Ces régimes induisent une obésité chez les animaux, qui présentent aussi une IR au bout de 16 semaines. La stéatose induite par le régime apparaît dans le foie des animaux dès les premières semaines de régime et l'inflammation n'est observée qu'après 12 semaines de régime. Cependant, l'utilisation d'un régime riche en graisse est moins agressive que les régimes présentés précédemment et l'apparition d'une faible fibrose ne peut être observée qu'après 36 à 50 semaines d'exposition des souris au régime (Van Herck, Vonghia and Francque, 2017).

Il est possible de supplémenter les régimes précédents avec du **cholestérol** (1%) qui favorise l'apparition de l'inflammation ou même avec du **glucose et du fructose** pour stimuler la lipogenèse *de novo* et exacerber la stéatose ainsi que l'inflammation hépatique (Santhekadur, Kumar and Sanyal, 2018). Le régime AMLN (amylin), composé de 40% de graisse (dont 22% de trans-fat et 26% d'acides

gras saturés en masse), de 22% de fructose et de 2% de cholestérol ; ainsi que sa variation, le GAN (Gubra Amylin NASH, avec 0% de trans-fat et 46% d'acides gras saturés en masse) sont notamment utilisés pour induire la NASH. Les souris développent, en réponse à ces régimes, une obésité et une intolérance au glucose dès 8 semaines de régime. De plus, les souris nourries avec le régime AMLN développent tous les paramètres histologiques de NASH dès 16 semaines de régime avec une sévérité plus importante pour les souris nourries avec le GAN (Boland *et al.*, 2019).

Les régimes présentés précédemment permettent d'obtenir rapidement une stéatose et une inflammation dans les foies des souris mais il est difficile de reproduire des stades de fibrose avancée ainsi que des dommages hépatocellulaires comparables à ce qui est observé chez l'humain. Pour étudier de tels processus, il est possible de traiter les souris avec des **produits chimiques**. En effet, le tétrachlorure de carbone (CCl₄) est utilisé pour induire une fibrose hépatique. L'injection de ce composé crée un stress oxydant et favorise la formation de lipides et de protéines peroxydées induisant une nécrose du tissu ainsi qu'une fibrose. Il a été montré que la combinaison de ce traitement à un régime riche en graisse potentialise les effets du régime et aggrave les dommages hépatiques vers les stades de NASH et de fibrose (Unsal, Cicek and Sabancilar, 2021). De même, les manifestations des dommages hépatocellulaires observées chez l'humain, telles que les cellules ballonisées ou la formation de MDB, ne sont que très peu observées dans les modèles cités précédemment. Il a été montré que l'ajout de DDC à la nourriture de souris pendant 10 semaines induit la formation de MDB en inhibant, notamment, la dégradation protéasomale. Les protéines malformées s'accumulent sous la forme d'agrégats semblables à ceux qui se développent lors des NAFLD. Néanmoins, les souris nourries avec le DDC ne développent qu'une hépatite chronique et elles ne présentent pas d'obésité ou de stéatose caractéristique de la NASH (French *et al.*, 2011).

2. Modèles génétiques

Dans les modèles précédents, le fond génétique des souris le plus majoritairement utilisé est celui des C57Bl6/ J. En effet, il a été montré que ces souris répondent mieux aux stimuli métaboliques que d'autres fonds génétiques. Cependant, les facteurs menant à la NASH peuvent aussi être reproduits via des modifications génétiques.

Dans le cadre des études autour des maladies induites **par l'obésité**, des souris déficientes pour le gène codant la leptine, ob/ob, ou pour le gène codant le récepteur à la leptine, db/db, ont été développées. La leptine jouant un rôle clé dans le processus de satiété, ces souris hyperphages deviennent rapidement obèses et insulino-résistantes. Elles développent spontanément une stéatose avec une inflammation modérée et sont souvent nourries avec des régimes déficients en choline pour les voir développer une NASH (Sanches *et al.*, 2015). De même, des souris diabétiques polygéniques ont été obtenues par sélection génétique via des croisements consanguins : les souris TSOD (Tsumura

Suzuki Obese Diabetes). Ce sont aussi des souris obèses qui développent spontanément une NASH au bout de 4 mois. Elles ne présentent qu'une faible fibrose, mais leur état peut évoluer vers l'HCC après l'âge d'un an (Shimada *et al.*, 2012).

Une autre classe de souris génétiquement modifiées développées **pour l'étude des NAFLD** inclus les souris FLS (Fatty Liver Shionogi) ainsi que les souris foz/foz. Les souris FLS, comme les souris TSOD, ont été obtenues par sélection après croisements consanguin et elles développent spontanément une NASH. En effet, ces souris présentent une diminution de la sécrétion des VLDL ainsi qu'une sensibilité accrue aux cytokines pro-inflammatoires. Les souris foz/foz, présentent une mutation du gène *Alms1* (Alstrom syndrome 1) et sont hyperphages. Elles sont obèses, insulino-résistantes et développent spontanément une NASH dont l'apparition est accélérée quand les souris reçoivent un régime « Western » riche en graisse. À ce jour, les mécanismes impliqués dans ce phénomène ne sont pas encore élucidés (Jacobs *et al.*, 2016).

Enfin, des souris portant **les mutations génétiques associées au développement des NAFLD** chez l'humain ont été étudiées, et ce plus particulièrement sur le gène *PNPLA3*. De façon surprenante, les souris déficientes pour *Pnpla3* soumises à un régime riche en carbohydrates ne développent pas de stéatose (Chen *et al.*, 2010). Cependant, la surexpression du mutant humain I148M chez la souris induit une accumulation hépatique de TG sans être associée ni à une IR ni à une intolérance au glucose (Li *et al.*, 2012).

ii. *In vitro*

Malgré la nécessité de se placer dans un organisme global pour étudier la pathogenèse des NAFLD, l'utilisation d'outils *in vitro* est complémentaire, notamment lorsqu'il s'agit d'élucider les mécanismes moléculaires impliqués dans le développement de la pathologie.

En lien avec les différents modèles *in vivo* présentés ci-dessus, il est possible d'isoler les **cellules primaires** du foie de souris ou d'humain atteints de NAFLD dans le but de les cultiver. Cette technique permet de stimuler les cellules directement avec des composés tels que des inhibiteurs, des agonistes, etc. L'avantage de ces cellules est qu'elles sont au plus proche des cellules telles qu'elles fonctionnent dans le foie métaboliquement. Cependant, l'isolement de cellules primaires est une technique difficile et peu reproductible. De plus, les cellules primaires humaines de patients sont rares. Enfin, hors de la matrice tissulaire, les cellules se différencient rapidement, ce qui empêche une culture sur le long terme (Schyschka *et al.*, 2013).

Lors de la culture de cellules primaires en 2 dimensions, un seul type cellulaire est cultivé à la fois ce qui ne permet pas de modéliser les interactions entre les différents types cellulaires présents dans le foie ni de reproduire l'organisation cellulaire de l'organe. Pour pallier ce problème, il est

possible d'associer plusieurs types cellulaires lors d'une culture en 3 dimensions que l'on appelle **organoïde**. Ainsi, le traitement de ces organoïdes avec des SFA induit une accumulation de lipides dans les hépatocytes comparable à une stéatose. La sécrétion de cytokines et même parfois l'apparition de cellules ballonnées peuvent également être observé dans les organoïdes de foie (Nuciforo and Heim, 2021). De plus, la mise en culture de coupes issues de foie est aussi une technique qui permet de conserver une organisation cellulaire similaire à celle du tissu. Cette technique, appelée **PCLS** (Precision-Cut Liver Slices), consiste en la mise en culture de coupes de tissu fraîches et a pour principal avantage de conserver les différents types cellulaires présents dans le tissu. Une fois en culture, ces coupes peuvent être traitées avec des molécules thérapeutiques par exemple pour tester l'efficacité de ces dernières et soumises à des analyses transcriptomiques ou histologique par exemple (Gore *et al.*, 2020).

L'obtention de cellules primaires ou de tissus humains étant difficile, la création de modèles de NAFLD *in vitro* à partir de lignées cellulaires a été envisagée. L'exposition de **lignées hépatocytaires**, comme les Huh7 ou les HepG2, à des fortes concentrations de glucose ou de SFA a été réalisée pour mimer les conditions de la NASH. De fortes concentrations en glucose dans le milieu de culture des Huh7 induisent une réponse inflammatoire dans la cellule via la voie NF- κ B, et l'ajout de cytokines pro-inflammatoire potentialise ces effets (Tilg and Hotamisligil, 2006). De plus, le traitement des HepG2 avec des mélanges d'acides gras induit une toxicité similaire à ce qui est observé lors d'une stéatose chronique. Ces hépatocytes stéatosés présentent une apoptose ainsi qu'une modulation des facteurs de transcription important dans le métabolisme des lipides, comme SREBP-1 et PPAR α (Ricchi *et al.*, 2009). Enfin, il a été montré que le traitement d'HepG2 avec de fortes doses de palmitate induit la formation d'agrégats semblables à des MDB (Cho *et al.*, 2018). Les hépatocytes impliqués dans le développement des NAFLD sont soumis aux concentrations circulantes en glucose et en acides gras mais ils sont aussi exposés aux sécrétomes des autres cellules qui composent le foie et plus largement au sécrétome des autres organes métaboliques. Pour mimer ce processus, il est possible de réaliser des co-cultures de plusieurs lignées cellulaires. Il a notamment été montré que la co-culture d'hépatocytes avec des adipocytes différenciés favorise le développement d'une IR (Wang *et al.*, 2006). La limite principale de ces modèles est que la plupart des lignées cellulaires prolifèrent car elles sont cancéreuses. Cependant, lors du développement du cancer, les cellules subissent une reprogrammation métabolique qui modifie certaines voies clés du métabolisme.

Ainsi, le modèle idéal pour l'étude des NAFLD n'existe pas. Cependant, la multiplicité des outils énoncés ci-dessus permet de progresser dans la compréhension des mécanismes impliqués dans le développement des NAFLD. Dans cette optique, les travaux présentés dans ce manuscrit de thèse sont le fruit de la combinaison de différentes approches *in vivo* et *in vitro* pour fournir des observations robustes et au plus proche des processus physiopathologiques qui se produisent dans le foie.

f. Traiter les NAFLD

Malgré le poids économique que les NAFLD représentent pour les sociétés actuelles et les complications qui menacent les malades, à ce jour, aucun traitement n'est recommandé dans les pays occidentaux pour soigner les NAFLD. Seules des stratégies basées sur l'application de règles hygiéno-diététiques (RHD), peu efficaces, ou sur la chirurgie bariatrique, fortement invasive, sont proposées aux patients. Cependant, grâce aux avancées faites ces dernières années dans la compréhension des mécanismes physiopathologiques impliqués dans le développement des NAFLD, de nombreuses molécules thérapeutiques sont en phase de tests.

i. La perte de poids

L'obésité est un facteur de risque important dans le développement des NAFLD, or, pour traiter ce facteur, les praticiens de santé peuvent mettre en place des RHD. En effet, il a été démontré qu'une **perte de poids** permettait de faire régresser efficacement les différents paramètres de la maladie. Une perte de poids entre 5 et 10% de la masse de l'individu est recommandée pour améliorer la stéatose, et une perte supérieure à 10% pour faire régresser la NASH (Promrat *et al.*, 2010). Cette perte de poids peut être initiée par la mise en place de **diètes**. La restriction calorique par exemple, améliore les enzymes de cytolysse hépatiques (ASAT et ALAT). De plus, une alimentation de type méditerranéenne, riche en fibre et faible en cholestérol et en sucres, améliore la stéatose hépatique même lorsque la perte de poids est faible ou inexistante (Trovato *et al.*, 2015).

La perte de poids peut aussi être initiée par un **acte chirurgical**. En effet, chez les patients en obésité morbide (IMC>40 ou IMC>35 avec comorbidités), la chirurgie bariatrique est un moyen efficace de perdre du poids qui a été recommandée par l'Institut National pour la Santé. Cette procédure rassemble 3 techniques qui ont pour objectif de modifier la façon dont sont absorbés les aliments par le système digestif. Pour cela, un bypass gastrique (court-circuit de l'estomac et d'une partie de l'intestin), une sleeve gastrectomie (réduction de la taille de l'estomac par ablation d'une partie de ce dernier) ou un anneau (réduction de la taille de l'estomac par la pose d'un anneau autour de celui-ci) peuvent être mis en œuvre par le chirurgien. Ces techniques induisent une perte de poids entre 15 et 25% de la masse de l'individu ayant subi la chirurgie et ont pour effet de favoriser la régression de la stéatose, de la NASH et de l'IR (Lassailly *et al.*, 2016).

ii. Les molécules thérapeutiques

Malheureusement, seuls les patients atteints de formes graves de NASH associées à une obésité morbide peuvent bénéficier d'une procédure de chirurgie bariatrique. De plus, la perte de poids par la mise en place d'une diète est très difficile à mettre en œuvre et ne perdure pas chez ces patients. La recherche de molécules, pour le traitement de ces maladies, est alors cruciale afin d'améliorer la prise en charge des patients atteints de NAFLD. Actuellement, de nombreuses molécules ont été ou sont en cours de développement, les molécules actuellement en phase 3 sont rassemblées dans le **Tableau 1** ci-après.

Tout d'abord, du fait des liens entre la pathogenèse du DT2 et des NAFLD, des **molécules utilisées pour traiter le DT2** sont testées pour la résolution des NAFLD. Le semaglutide, un agoniste du récepteur au GLP1 (Glucagon-Like Peptide 1), est actuellement en étude de phase 3. De nombreuses molécules **anti-fibrotiques** et **anti-inflammatoires** sont aussi en cours d'étude. En effet, le développement de la fibrose est un des plus importants facteurs de risque pour le développement de complications extra-hépatiques. Le ceniciviroc est un agoniste en étude de phase 3 qui inhibe les récepteurs des chimiokines 2 et 5 (CCR2/5) fait partie de ces molécules (Ratziu *et al.*, 2020).

Enfin, de nombreuses **molécules ciblant des acteurs majeurs du métabolisme des lipides** sont aussi en cours de développement. Les principales cibles qui ont pu être identifiées sont FXR, SCD1 et les PPAR. En étude de phase 3, pour ces cibles, se trouvent l'acide obéticholique, agoniste de FXR (Z. M. Younossi *et al.*, 2019) et l'aramchol, un modulateur de SCD1 (Ratziu *et al.*, 2021). Concernant les PPARs, plusieurs agonistes, sélectifs ou non, ont été développés : le lanifibranor est un pan-agoniste touchant tous les isotypes de PPAR, actuellement en cours d'étude de phase 2 (Lefere *et al.*, 2020). Le saroglitazar est un dual-agoniste PPAR α /PPAR γ en phase 3 et qui est déjà autorisé pour le traitement de la NASH en Inde (Gawrieh *et al.*, 2021). L'élafibranor, un autre dual-agoniste, PPAR α /PPAR δ a échoué en étude de phase 3 car il n'a pas permis d'atteindre l'objectif fixé de résolution de la NASH (Ratziu *et al.*, 2016a). Enfin, un agoniste sélectif de PPAR α , le pémafibrate, a fait l'objet d'une étude de phase 2 (Nakajima *et al.*, 2021).

L'autorisation du saroglitazar en Inde suggère un avenir prometteur pour les agonistes PPAR dans le traitement des NAFLD. Cependant, l'échec de certaines molécules comme élafibranor, montre qu'une meilleure connaissance des mécanismes de régulation des PPARs dans le foie au cours du développement des NAFLD est nécessaire (Fraile *et al.*, 2021).

Mode d'action	Nom	Phase d'essai clinique
Agonistes du récepteur FXR	Acide obéticholique	Phase 3 (terminée)
Agonistes de PPAR γ	Pioglitazone	Phase 4
Agonistes de PPAR α/γ	Saroglitazar	Phase 3
Agonistes de PPAR α/δ	Elafibranor	Phase 3 (arrêtée)
Agonistes de PPAR $\alpha/\gamma/\delta$	Lanifibranor	Phase 3
Inhibiteur du transporteur mitochondrial du pyruvate	MSDC-0602K	Phase 3
Analogues de FGF21	Efruxifermin	Phase 3
Analogues du GLP-1	Sémaglutide	Phase 3
Antioxydants	Vitamine E	Phase 3
Inhibiteurs du co-transporteur SGLT2	Dapagliflozine	Phase 3
Inhibiteur de SCD1	Aramchol	Phase 3
Agonistes du récepteur THR β	Resmetirom	Phase 3
Inhibiteur des récepteurs CCR2/5	Cenicriviroc	Phase 3 (arrêtée)
Inhibiteur de l'ASK1	Selonsertib	Phase 3 (arrêtée)

Tableau 1 : Principales cibles thérapeutiques en essais cliniques de phase 3 pour le traitement de la NASH (adaptée de Lucie Bernard, Thèse de Doctorat en Pharmacie, Lille, 2022).

Partie 3 : PPAR α , une cible thérapeutique contre la NASH

1) Description générale de PPAR α

a. Définition et localisations de PPAR α

PPAR α est un récepteur nucléaire codé par le gène *PPAR α* (ou NR1C1) présent sur le chromosome 22 chez l'humain et sur le chromosome 15 chez la souris, il fait partie de la famille des PPAR mentionnée précédemment. C'est un facteur de transcription activable par ses ligands naturels qui sont les acides gras, et par ses ligands synthétiques, qui sont les fibrates. PPAR α est majoritairement exprimé dans les tissus ayant une forte activité de catabolisme des acides gras comme le muscle squelettique, le cœur et le foie (Blanquart *et al.*, 2004).

PPAR α est principalement localisé dans le **noyau** des cellules présentes dans les tissus cités précédemment et il y exerce son activité de facteur de transcription. Cependant, il semble aussi se retrouver dans le **cytoplasme** de certaines cellules comme les macrophages (Chinetti *et al.*, 1998) ou les hépatocytes (Sumanasekera, Tien, Davis, *et al.*, 2003; Sumanasekera, Tien, Turpey, *et al.*, 2003).

b. Structure de PPAR α

La structure du récepteur PPAR α est semblable à de nombreux récepteurs nucléaires et est composée de quatre domaines qui se distinguent par leurs fonctions. PPAR α comprend, tout d'abord un **domaine A/B** en position N-terminale qui contient un domaine d'activation transcriptionnelle indépendante de la fixation des ligands : AF-1. Suit alors un **domaine C** de fixation à l'ADN (« DNA binding domain » DBD) composé de deux « zinc fingers » qui peuvent reconnaître les éléments réponse aux PPAR sur les promoteurs des gènes cibles du récepteur (« PPAR Response Elements » PPRE). PPAR α comprend aussi un **domaine charnière D** pouvant moduler les interactions avec l'ADN et les interactions avec d'autres protéines, telles que des cofacteurs. Enfin, un dernier **domaine E/F** en position C-terminale termine la structure de PPAR α . Ce domaine permet la fixation des ligands sur le récepteur et contient la fonction d'activation AF2. Cette activation passe par l'interaction entre PPAR α et un autre récepteur nucléaire RXR via le domaine E/F (**Fig. 17**). Enfin, PPAR α est une protéine de 55kDa (Aranda and Pascual, 2001).

Une **forme tronquée de PPAR α** a été mise en évidence, dans le foie humain uniquement, elle ne contient pas l'exon 6 de la protéine du fait d'un codon stop prématuré. En effet, PPAR α est composée de 8 exons codant pour les différents domaines de la protéine de son extrémité N-terminale

à l'extrémité C-terminale. L'exon 6 code pour une partie du domaine E/F et son absence prive la forme tronquée d'une partie de la région charnière et de ce domaine E/F. Cette protéine tronquée, d'environ 30kDa, ne peut donc pas se fixer sur les PPRE des gènes cibles habituels de PPAR α (Gervois *et al.*, 1999). Il a été montré que l'expression de la forme tronquée corrèle positivement, dans les foies humains, avec l'expression de la forme complète de PPAR α . Même si cette forme tronquée n'a pas d'activité transactivatrice, elle inhibe tout de même des voies impliquées dans la prolifération cellulaire (β -caténine/Wnt) et dans l'inflammation (NF- κ B)(Thomas *et al.*, 2015).

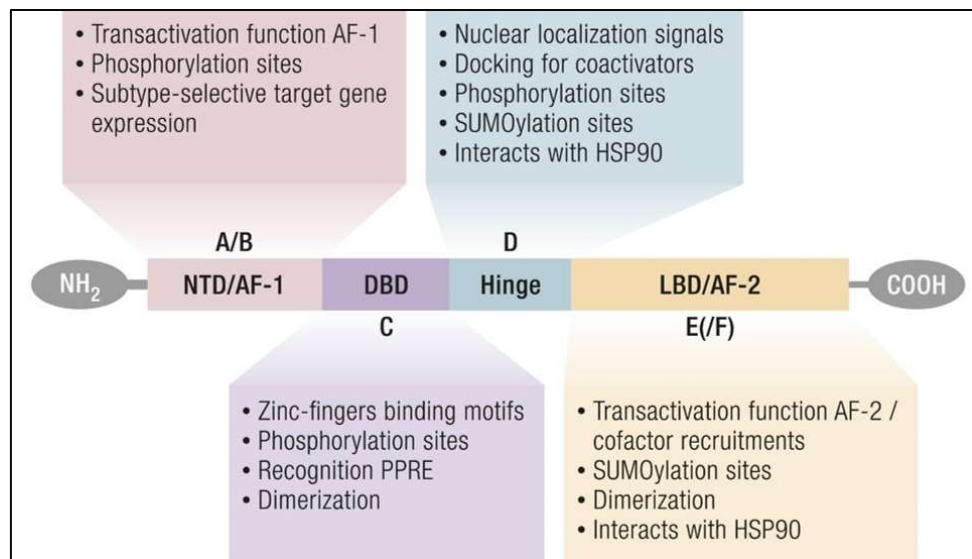


Figure 17 : Structure schématique de PPAR α (Bougarne *et al.*, 2018).

c. Mécanisme d'action de PPAR α

La régulation des cibles de PPAR α se fait via deux mécanismes principaux : la transactivation et la transrépression. Ces deux mécanismes se déclenchent lorsqu'un ligand de PPAR α se fixe sur son domaine LBD.

i. Les ligands de PPAR α

PPAR α , via son LBD, est activé par la fixation de ses ligands qui peuvent être des ligands naturels ou synthétiques.

Les principaux **ligands naturels** de PPAR α sont les acides gras et leurs dérivés qui se forment lors de la lipolyse, la lipogénèse ou le catabolisme des acides gras (Keller *et al.*, 1993). Les dérivés d'eicosanoïdes ou la fraction phospholipidique issue de l'oxydation des LDL ont aussi été identifiés comme des ligands endogènes de PPAR α (Yu *et al.*, 1995; Delerive *et al.*, 2000). Enfin, le resvératrol,

un polyphénol antioxydant présent dans le vin rouge et dans certains végétaux, ainsi que ses analogues favorisent l'activité hépatique de PPAR α *in vitro* et *in vivo* (Tsukamoto *et al.*, 2010).

Les premiers **ligands synthétiques** de PPAR α qui ont été développés sont les fibrates. Ce sont des agonistes de PPAR α , comme le fénofibrate ou le ciprofibrate, utilisés pour le traitement des hypertriglycéridémies ou des dyslipidémies. Cependant, ces derniers sont de faibles agonistes et des différences entre l'efficacité sur le récepteur humain et le récepteur murin ont été identifiées avec, par exemple, pour le fénofibrate un EC50 de 18,000 nM chez la souris vs un EC50 = 30,000 nM chez l'humain. De plus, du fait de leurs structures proches, les différents isotypes de PPARs peuvent être activés par un même ligand, c'est le cas pour le bezafibrate qui est un pan-agoniste activant aussi bien PPAR α , δ et γ . Cette caractéristique peut être un avantage favorisant l'action de tous les PPARs dans l'organisme, mais ce manque de spécificité peut aussi induire des effets secondaires non désirés (Staels, Maes and Zambon, 2008).

La recherche de nouveaux agonistes de PPAR α , plus puissants et plus sélectifs, a permis d'identifier les SPPARM α (Selective PPAR α Modulators). Ce sont des agonistes puissants qui ciblent spécifiquement un ou plusieurs PPAR et qui ont pour but d'améliorer l'efficacité des traitements tout en diminuant les effets secondaires. Certains de ces composés activent deux des trois isotypes de PPAR, c'est le cas des dual-agonistes PPAR α / γ aleglitazar (Bénardeau *et al.*, 2009) et PPAR α / δ GFT-505 (ou élafibranor, EC50=10-20nM) par exemple. Des agonistes sélectifs de PPAR α entrant dans la catégorie des SPPARM α ont également été développés, comme LY518674 (Millar *et al.*, 2009), GW7647 (Brown *et al.*, 2001) et K-877 (ou pémafibrate E50=1nM)(Kawasaki *et al.*, 2020).

ii. Transactivation

Une fois **activé par un ligand**, PPAR α se lie avec un autre récepteur : RXR (Retinoid X Receptor) pour former un hétérodimère. Cet hétérodimère peut être activé soit par les ligands de PPAR α soit par ceux de RXR, l'hétérodimère est alors qualifié de permissif. Une fois activé, ce dimère se fixe sur les PPRE situés à l'extrémité 5' des gènes cibles de PPAR α qui sont composés de séquences hexamériques AGGTCA, c'est le mécanisme de transactivation (Gervois *et al.*, 1999). La transactivation est notamment le mécanisme à l'origine de la régulation de l'homéostasie glucidique et lipidique par PPAR α (**Fig. 18**).

Il est aussi possible que PPAR α agisse sur des cibles **indépendamment de la fixation de ses ligands**. En effet, il a été démontré que le domaine AF-1 de PPAR α interagit avec des cibles de façon indépendante de la fixation des ligands via une interaction directe avec la partie hélicoïdale du domaine A/B. En outre, le domaine AF-2 semble aussi permettre la régulation de gènes cibles de PPAR α en l'absence de ligand via le recrutement de cofacteurs (Feige *et al.*, 2005).

iii. Cofacteurs de PPAR α

Comme les autres récepteurs nucléaires, l'activité transactivatrice de PPAR α est régulée par des cofacteurs. La fixation de ces cofacteurs peut favoriser ou défavoriser l'activité de PPAR α en fonction du contexte, on parle alors respectivement de coactivateur ou de corépresseur.

PPAR α se fixe à ses **corépresseurs** NCoR et SMRT (Silencing Mediator of Retinoid and Thyroid receptors) réprimant son activité en l'absence de ligand ou lors d'un traitement avec un antagoniste. Ces corépresseurs sont remplacés par des complexes coactivateurs dès la fixation d'un ligand. Un autre corépresseur connu de PPAR α est RIP140 (Receptor Interacting Protein 140) qui entre en compétition avec les coactivateurs pour recruter des effecteurs tels que les histones déacétylases (Miyata *et al.*, 1998). La régulation de ces corépresseurs est essentielle pour l'action de PPAR α , notamment dans le maintien de l'homéostasie lipidique. Il a notamment été démontré que l'inhibition de l'autophagie dans le foie de souris induit une accumulation de NCoR1 et conduit à une répression accrue de PPAR α . Les auteurs observent alors une diminution de la production de corps cétoniques ainsi qu'une altération de l'oxydation des lipides en réponse à un jeûne de 24 heures (Saito *et al.*, 2019).

Les corépresseurs sont échangés avec les complexes coactivateurs lors de la fixation d'un ligand sur PPAR α grâce à des **facteurs d'échange** de corépresseurs nucléaires. TBL1 (transducin β -like protein 1) et TBL1R (TBL-related 1) sont deux facteurs semblant jouer ce rôle pour PPAR α . En effet, ces facteurs sont des régulateurs de NCoR et SMRT. Toutefois, certaines études indiquent que TBL1 et TBL1R jouent un rôle de coactivateurs dans le foie pour PPAR α . Cette ambivalence semble s'expliquer par le fait que TBL1 et TBL1R sont nécessaires au mécanisme d'échange entre corépresseurs et coactivateurs qui est déclenché par la fixation de ligands à PPAR α (Perissi *et al.*, 2004).

Les **coactivateurs** de PPAR α vont, quant à eux, favoriser la transcription des gènes cibles et il existe plusieurs catégories de coactivateurs en fonction de leur mode d'action. Certains de ces facteurs agissent en modifiant la localisation et la conformation du nucléosome pour remodeler la chromatine en utilisant l'énergie provenant de l'hydrolyse de l'ATP. C'est notamment le cas pour certaines protéines de la famille SWI/SNF (switch/sucrose non-fermenting) avec les complexes PRIC (PPAR α interacting complexes) (Surapureddi *et al.*, 2002). D'autres coactivateurs modifient la chromatine directement de façon covalente au niveau des motifs d'histone. Certains ont une activité d'histone méthyltransférase ou acétyltransférase. SRC-1 (steroid receptor coactivator 1), CBP (CREB binding protein) et p300, par exemple, favorisent l'activité transcriptionnelle de PPAR α en augmentant l'acétylation des motifs d'histones mais aussi en favorisant l'interaction avec la machinerie transcriptionnelle (Chen *et al.*, 1997). D'autres coactivateurs, favorisent la formation de complexes coactivateurs en jouant un rôle d'échafaudage (« scaffolds ») comme PGC1 α et PGC1 β . Ces facteurs

favorisent aussi la coordination entre la transcription et l'épissage de l'ARN (Oberkofler *et al.*, 2002). Une autre classe de coactivateurs, composée de sous-unités multiples Med/TRAP/DRIP (Mediator/Thyroid hormone Receptor-Associated Protein/vitamin D Receptor Interacting Protein) agit en favorisant l'ancrage de PPAR α à la machinerie transcriptionnelle ainsi que le recrutement et l'activation de l'ARN polymérase II (Jia *et al.*, 2004). Ces coactivateurs ne sont pas spécifiques à l'activation de PPAR α et agissent, pour certains, sur d'autres facteurs de transcription tels que les autres isoformes de PPAR ou les SREBPs ce qui rend leur étude complexe (Feige *et al.*, 2006).

iv. Transrépression

Enfin, l'action de PPAR α sur ses cibles se fait aussi **sans fixation sur l'ADN**. En effet, le récepteur peut bloquer la transcription d'un gène soit grâce à une interaction protéine-protéine directe soit séquestrer les cofacteurs nécessaires à l'activité d'une protéine, ce mécanisme est appelé transrépression. Il est notamment établi que PPAR α interagit directement avec les sous-unités p65 de NF- κ B et c-Jun de AP-1 pour inhiber les voies inflammatoires associées (Delerive *et al.*, 1999). PPAR α entre aussi en compétition avec C/EBP β (CCAAT/Enhancer-Binding Protein β) pour la fixation au coactivateur GRIP1 (Glutamate Receptor Interacting Protein 1)/TIF2 (Transcriptional Mediators/Intermediary Factor 2)/SRC2 ce qui a pour effet de réprimer l'activation du promoteur du fibrinogène par C/EBP β (Gervois *et al.*, 2001). Le mécanisme de transrépression est associé à la fonction anti-inflammatoire de PPAR α notamment (**Fig. 18**).

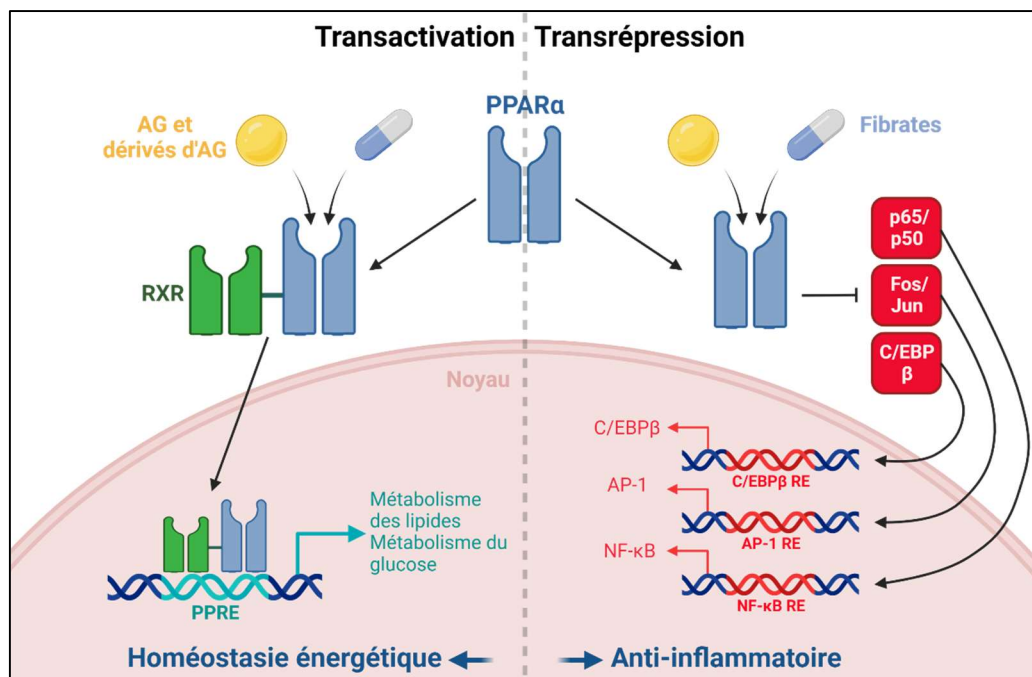


Figure 18 : Mécanisme d'action de PPARα (adapté de Bougarne *et al.*, 2018).

Les mécanismes de transactivation (à gauche) et de transrépression (à droite) de PPARα.

2) Modulation de l'expression et de l'activité de PPARα

L'expression et l'activité de PPARα sont régulées via de nombreux facteurs pouvant être environnementaux, comme le statut nutritionnel ou le rythme circadien, ou moléculaire, comme l'action d'autres récepteurs nucléaires, ou des modifications post-traductionnelles (**Fig. 19**).

a. Via le sexe

L'expression de PPARα varie suivant le sexe. En effet, l'expression du récepteur nucléaire est moins importante dans les foies des souris et des rats femelles. Cette différence semble être due aux hormones sécrétées par les organes sexuels puisqu'une ablation des gonades induit une diminution de l'expression de Ppara dans le foie des mâles alors que, chez la femelle, l'expression hépatique de Ppara tend à augmenter (Jalouli *et al.*, 2003). Cette différence d'expression de Ppara entre mâles et femelles se répercute sur le métabolisme des lipides et du glucose dépendant de PPARα. Dans ce sens, il a été démontré que les souris déficientes pour Ppara développent spontanément, au bout de 8 mois, une dyslipidémie accompagnée d'une stéatose chez le mâle alors que chez la femelle, une adiposité accrue est observée (Costet *et al.*, 1998). Ces observations ont été confirmées chez les souris déficientes pour Ppara spécifiquement dans les hépatocytes. Enfin, lorsque des souris sont nourries avec un régime riche en graisse, les femelles développent une stéatose et une inflammation moins

sévère que les mâles ce qui suggère que le dimorphisme sexuel de l'expression de *Ppara* protège les femelles des désordres métaboliques (Smati *et al.*, 2022). Chez l'humain, l'expression de *PPARα* corrèle positivement à l'expression d'environ 600 gènes dans le foie des hommes alors que seulement 250 gènes corrèlent positivement avec l'expression de *PPARα* dans les foies des femmes appartenant à une cohorte de patients atteints de NAFLD. Ces résultats suggèrent un impact du sexe sur la régulation des gènes cibles de *PPARα*. Cependant, les cohortes de patients étudiées dans le cadre de ces maladies comprennent de nombreuses patientes en pré-ménopause. Or, ce statut hormonal particulier induit une variabilité qui complexifie l'étude de l'impact du dimorphisme sexuel dans le développement des maladies métaboliques (Smati *et al.*, 2022).

b. Via le statut nutritionnel

PPARα joue un rôle crucial dans les mécanismes impliqués dans la transition de la période pré-prandiale à la période post-prandiale et son expression ainsi que son activité sont finement régulées lors de cette transition. En effet, une augmentation de l'expression de *Ppara* est observée dans le foie de souris sauvages soumises à un jeûne long (24 heures). Le même jeûne, réalisé chez des souris déficientes, pour *Ppara* induit une accumulation de lipides dans le foie, une hypoglycémie, une hypothermie, ainsi qu'une augmentation des acides gras circulants (Kersten *et al.*, 1999). Plus récemment, Régnier *et al.* ont démontré que l'expression de *Ppara* spécifiquement dans les hépatocytes est nécessaire au maintien de l'homéostasie énergétique en réponse au jeûne (Régnier *et al.*, 2018). Enfin, l'activation de *PPARα* en réponse au jeûne par ses ligands naturels ne dépend pas de la nature des acides gras contenus dans l'alimentation. En effet, l'exposition de souris à des régimes riches en acides gras polyinsaturés induit l'expression hépatique des gènes cibles de *Ppara* de la même façon que dans les foies de souris nourries avec une majorité d'acides gras saturés en réponse au jeûne (Polizzi *et al.*, 2016).

Ces variations sont associées à des mécanismes moléculaires déclenchés en réponse aux variations de nutriments observées lors de la transition entre la période pré-prandiale et la période post-prandiale.

De nombreuses **kinases**, connues pour phosphoryler *PPARα*, sont régulées lors de cette transition et participent au contrôle de l'activité de *PPARα* dans l'un ou l'autre des statuts nutritionnels. En effet, les MAPK, activées par l'insuline, et les PKCs, activées par le glucose phosphorylent *PPARα* en période post-prandiale dans les hépatocytes humains (Brunmeir and Xu, 2018).

En période post-prandiale, le pancréas sécrète de l'insuline activant **mTORC1** (mTOR Complex 1) en induisant sa phosphorylation via la voie PI3K (Phosphatidylinositol 3-kinase). mTORC1 est un

complexe formé de mTOR, Raptor (Regulatory-Associated Protein of mTOR), PRAS40 (Proline-Rich Akt Substrate of 40kDa), Deptor (DEP domain-containing mTOR-interacting protein) et G/LST8 (mLST8/GβL). Or, l'inhibition de mTORC1 chez la souris induit une relocalisation du corépresseur de PPARα, NCoR1 vers le cytoplasme ce qui favorise l'activité de PPARα (Sengupta *et al.*, 2010).

Lors du jeûne, le glucagon induit l'AMP (Adenosine monophosphate) cyclique (cAMP) ainsi que la PKA (dépendante de cAMP) qui favorisent aussi la phosphorylation de Pparα dans des hépatocytes primaires murins (Lazennec *et al.*, 2000). Dans cette phase, l'activité de PPARα dans les hépatocytes est aussi stimulée par l'AMPK (AMP-activated Protein Kinase). En effet, l'AMPK est sensible au statut énergétique de la cellule via les ratios AMP/ATP et s'active lorsque ce dernier est élevé (Bronner, Hertz and Bar-Tana, 2004).

c. Via le rythme circadien

Il est connu que les expressions géniques et protéiques de PPARα sont régulées par le rythme circadien. En effet, l'expression de PPARα est maximale lors de la période de repos (ZT8-12) et est induite par les corticostéroïdes plasmatiques libérés en réponse au stress. De plus, chez la souris, l'expression de PPARα est induite par la fixation de l'hétérodimère BMAL1-CLOCK (Brain and Muscle Aryl hydrocarbon receptor-Like protein 1 - Circadian Locomotor Output Cycles protein Kaput), régulateur positif de l'horloge, directement sur le promoteur de PPARα ce qui favorise son expression et son activité. D'autre part, REV-ERBα (Reverse gene of thyroid receptors α), un répresseur de BMAL1, peut entrer en compétition avec PPARα en se fixant sur les PPRE de certains gènes cibles et ainsi bloquer leur transcription PPARα dépendante (Berthier *et al.*, 2021).

d. Via des récepteurs nucléaires

i. Récepteur aux glucocorticoïdes (GR)

Les GR sont des récepteurs aux glucocorticoïdes (GC), molécules ayant des propriétés anti-inflammatoires. Plusieurs isoformes de ces récepteurs existent : GRα, β, γ, A et P et il a été démontré que l'isoforme principalement responsable de l'action des GC est GRα. Ce dernier est connu pour entrer en synergie avec PPARα dans des hépatocytes murins en condition pro-inflammatoire afin de favoriser le métabolisme des lipides et inhiber l'inflammation (Lee *et al.*, 2015; Bougarne *et al.*, 2019). De plus, il a été montré qu'une expression élevée de l'isoforme Grβ, dominant négatif et antagoniste de Grα, dans le foie de souris favorise le développement de la stéatose hépatique et inhibe l'expression de Pparα (Marino *et al.*, 2016).

ii. FXR (Farnesoid X Receptor)

Le récepteur nucléaire FXR, lui aussi exprimé dans les hépatocytes est activé par les acides biliaires et régule le métabolisme des acides biliaires et des lipides. Il a été démontré que l'activation de FXR par l'acide chénodeoxycholique ou le GW4064 induit l'expression génique de *PPAR α* dans les HepG2. Cette activation est due à la présence d'un élément de réponse à FXR sur le promoteur de *PPAR α* . Cet élément de réponse ne semble pas être présent sur le promoteur du gène *Ppara* murin. Il existe donc un cross-talk entre *PPAR α* et FXR dans les hépatocytes humains favorisant l'expression et l'activité de *PPAR α* (Pineda-Torra *et al.*, 2003).

iii. Lui-même

Sur le promoteur de *PPAR α* se trouve un élément de réponse au récepteur HNF4 (α HNF4-RE). Ainsi, HNF4 (Hepatocyte Nuclear Factor 4) induit la transcription de *PPAR α* en se fixant sur cet élément de réponse mais il a été démontré que les dimères *PPAR α* /*RXR α* sont aussi capables de se fixer sur α HNF4-RE. Dans ces conditions, α HNF4-RE fonctionne comme un PPRE sur lequel se fixe *PPAR α* pour induire la transcription de *PPAR α* lui-même. Ce mécanisme révèle une boucle de régulation du récepteur qui favorise sa propre expression quand il est induit et, au contraire, favorise son inhibition quand le récepteur est peu exprimé (Pineda-Torra *et al.*, 2002).

e. Via l'ubiquitinylation

La dégradation de *PPAR α* se fait principalement via la voie du protéasome après polyubiquitinylation. En effet, l'ubiquitinylation est la fixation covalente d'une ou plusieurs molécules d'ubiquitine via une cascade enzymatique. Ces chaînes d'ubiquitine sont ensuite reconnues par le 26S protéasome qui se charge de dégrader la protéine ubiquitinylée. Cette polyubiquitinylation est régulée par les ligands de *PPAR α* qui vont avoir un effet stabilisateur dans les hépatocytes en limitant l'ubiquitinylation du récepteur nucléaire (Blanquart *et al.*, 2002). D'autre part, la fixation de PAQR3 (Progesterin and adipoQ receptor 3), une protéine transmembranaire, sur le domaine de fixation à l'ADN de *PPAR α* favorise son ubiquitinylation via le recrutement de l'E3 ligase HUWE1 (HECT UBA and VWE domain containing protein 1). Les auteurs démontrent *in vivo* que l'inhibition de Paqr3 chez la souris stabilise *Ppara* et favorise le métabolisme des lipides dans le foie (Zhao *et al.*, 2018). Au contraire, un autre membre de la famille des PAQR, PAQR9, est surexprimé en réponse au jeûne et protège *PPAR α* de l'ubiquitinylation. Effectivement, PAQR9 entre en compétition avec *PPAR α* pour l'interaction avec

HUWE1 stabilisant ainsi PPAR α et favorisant la cétogenèse et la β -oxydation des acides gras (Lin *et al.*, 2021). Enfin, l'interaction de PPAR α avec MDM2 (Mouse Double Minute 2) a été identifiée. MDM2 est une E3-ligase connue pour réguler négativement l'activité et l'expression de p53 et semble interagir avec le domaine A/B de PPAR α pour favoriser son ubiquitinylation puis sa dégradation via le protéasome (Gopinathan *et al.*, 2009).

f. Via la phosphorylation

Comme mentionné plus tôt, PPAR α peut être régulée par des réactions de phosphorylation qui sont favorisées par des stimuli tels que l'insuline mais aussi par ses agonistes comme le ciprofibrate. Il existe plusieurs sites de phosphorylation sur PPAR α ayant pour effet de moduler son expression et sa fonction transactivatrice.

Des sites de phosphorylation ont ainsi été identifiés sur les **sérines 12 et 21**. Ces sites sont sur la zone AF1 du domaine A/B et sont la cible de MAPK (Juge-Aubry *et al.*, 1999) et de CDK7 (Cyclin-dépendant kinase 7). La phosphorylation des sérines 12 et 21 est associée à une augmentation de la transactivation qui semble être due à une diminution du recrutement du corépresseur NCoR et/ ou une augmentation de celui du coactivateur PGC1 α (Compe *et al.*, 2005).

De même, il a été montré que PKC α et PKC β II phosphoryle PPAR α sur les **sérines 179 et 230** ce qui induit un switch de l'activité de PPAR α dans les hépatocytes humains. Ainsi, l'inhibition de cette phosphorylation favorise la transrépression par PPAR α au détriment du mécanisme de transactivation *in vitro* (Blanquart *et al.*, 2004). De plus, les PKCs semblent aussi moduler l'expression de PPAR α dans les hépatocytes de rat (Yaacob *et al.*, 2001). *In vivo*, il a également été démontré que le traitement de souris avec une statine inhibe la phosphorylation de Ppar α par Pk α ce qui favorise son activité transrépressive anti-inflammatoire dans les hépatocytes et dans les macrophages. Cependant, aucun impact de la phosphorylation par Pk α n'est observé sur la fonction transactivatrice de Ppar α dans les macrophages des souris traitées avec les statines (Paumelle *et al.*, 2006).

D'autre part, la phosphorylation de la **sérine 73** par GSK β (Glycogen synthase kinase β) favorise la dégradation de PPAR α . De façon intéressante, il a été montré que des souris ayant un syndrome de Gilbert, caractérisé par une altération de la conjugaison de la bilirubine due au polymorphisme UGT1A1, sont protégées contre le développement d'une stéatose en réponse à un régime riche en graisses. Ces souris présentent une meilleure expression et activité de PPAR α associée à une diminution de sa phosphorylation sur la sérine 73 qui, selon les auteurs, pourrait être inhibée par la bilirubine (Hinds *et al.*, 2017).

g. Via la SUMOylation

Les SUMO sont des protéines de la famille des « ubiquitin-like » qui se fixent de façon covalente à d'autres protéines par une réaction enzymatique appelée SUMOylation. Il existe trois isoformes appelées SUMO1, SUMO2 et SUMO3. La forme murine de Ppar α est SUMOylée sur la lysine 358 induisant la répression spécifique du gène Cyp7b1 (Leuenberger, Pradervand and Wahli, 2009). De plus, la forme humaine de PPAR α est aussi monoSUMOylée par SUMO-1 qui se fixe sur la lysine 185 au niveau de la région charnière de la protéine. Cette SUMOylation a pour effet de recruter le corépresseur NCoR, de diminuer la transactivation de PPAR α et de réprimer la transcription de certains gènes comme PDK4 (Pyruvate Dehydrogenase Kinase 4), par exemple. La SUMOylation de PPAR α humain est diminuée en présence des ligands du récepteur nucléaire (Pourcet *et al.*, 2010).

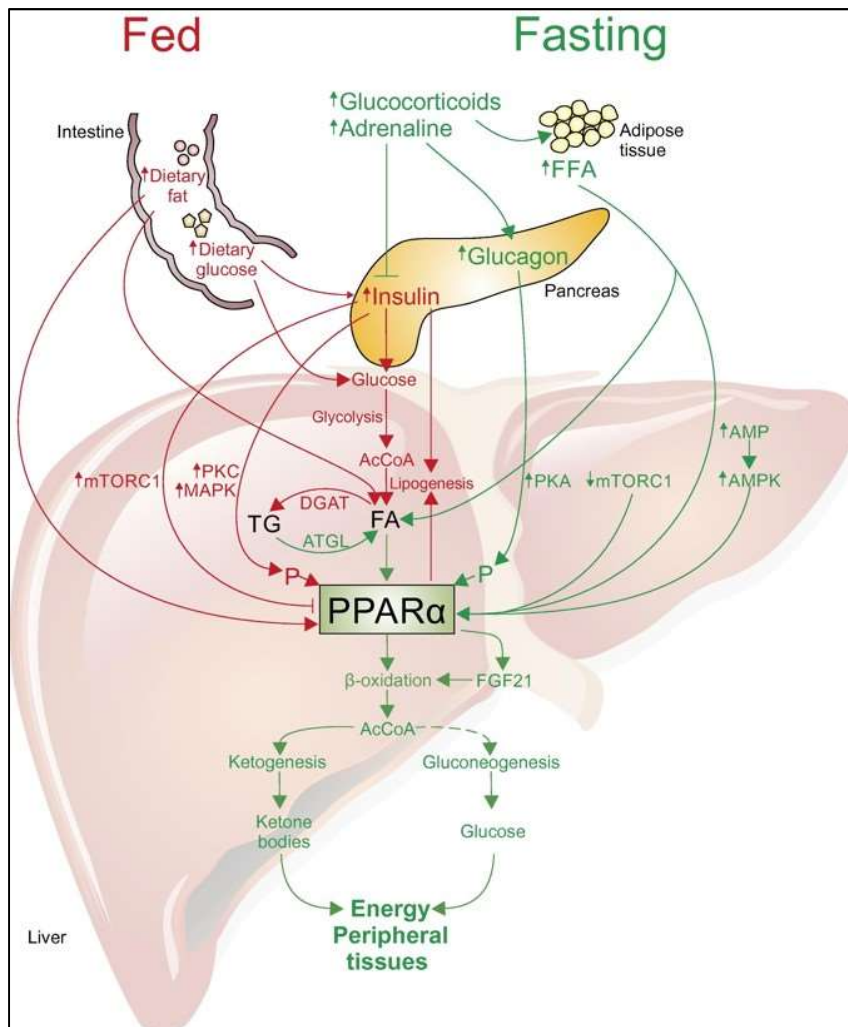


Figure 19 : Principales voies de régulation de PPAR α dans le foie (Pawlak *et al.*, 2015).

Représentation schématique de la régulation de PPAR α dans le foie dans la période post-prandiale (« fed », en rouge à gauche) et pré-prandiale (« fast », en vert à droite).

3) Rôles de PPAR α dans le foie

PPAR α est un régulateur majeur de nombreuses fonctions hépatiques. En effet, il régule la réponse à l'inflammation ainsi que les métabolismes du glucose et du glycérol mais aussi, et de façon très importante, le métabolisme des lipides sur lequel le plus de précisions seront apportées afin de mieux mettre en lumière le travail de thèse présenté par la suite. L'action de PPAR α passe par la transcription de ses gènes cibles dont les principaux sont rassemblés dans le **Tableau 1** ci-dessous.

a. Action sur l'inflammation aiguë

Lors d'une inflammation aiguë systémique, il a été démontré que l'activation de PPAR α par un agoniste *in vivo* réprime la **réponse inflammatoire aiguë dans le foie**. En effet, l'administration de fénofibrate à des souris traitées avec de l'I16 pendant 4 heures inhibe l'expression hépatique de *Saa* (Serum Amyloid A), *Hg* (Haptoglobine) et des *Fibrinogène α , β et γ* , marqueurs spécifiques de la réponse inflammatoire aiguë (Gervois *et al.*, 2004). De plus, l'injection de LPS à des souris déficientes pour Ppar α induit une augmentation de l'expression hépatique de ces mêmes marqueurs d'inflammation. Cette augmentation est alors réprimée lorsque l'expression de Ppar α est restaurée dans le foie par hydroperation et que les souris sont traitées avec le fénofibrate. De façon intéressante, l'expression d'*Il1*, *Il6* et *Tnf* dans l'aorte de ces mêmes souris est également réprimée ce qui suggère que l'effet bénéfique de l'activation de Ppar α dans le foie se répercute sur l'inflammation des autres organes, notamment du système vasculaire (Mansouri *et al.*, 2008). L'action anti-inflammatoire de PPAR α réside dans son activité transrepressive directe de certaines protéines impliquées dans la réponse inflammatoire telles que NF- κ B (Pawlak *et al.*, 2014). Il est intéressant de noter que PPAR α induit dans le foie la transcription de gènes anti-inflammatoires tels qu'*IL1ra* (Interleukin-1 receptor antagonist)(Stienstra *et al.*, 2007) ou *ikK β / α* (ik Kinase)(Kleemann *et al.*, 2003) ce qui suggère une contribution de l'activité transactivatrice de PPAR α dans la régulation de l'inflammation.

En plus de cet impact direct de PPAR α sur les acteurs de l'inflammation, le rôle de PPAR α dans la régulation du métabolisme est important lors d'une inflammation aiguë. En effet, les souris déficientes pour PPAR α présentent une hypoglycémie sévère et une survie réduite en réponse à une infection bactérienne par rapport à des souris sauvages. Il a été démontré que dans ce contexte, où les cellules immunes puisent dans les réserves de glucose via la glycolyse pour faire face à l'infection,

PPAR α est nécessaire au maintien de l'homéostasie énergétique dans les hépatocytes. En l'absence de Ppar α , les hépatocytes ne sont pas capables de changer de source d'énergie pour passer de l'utilisation du glucose, moins disponible, à l'utilisation des lipides, ce qui aggrave l'hypoglycémie de ces souris. Ces résultats démontrent que le rôle métabolique de PPAR α dans le foie est crucial pour le maintien de l'homéostasie énergétique lors de la réponse à une inflammation aiguë (Paumelle *et al.*, 2019).

b. Action sur le métabolisme du glucose/ glycérol

Les souris déficientes pour PPAR α présentent une sévère hypoglycémie en réponse au jeûne ce qui suggère un rôle important pour PPAR α dans le **métabolisme du glucose et du glycogène** (Kersten *et al.*, 1999). Chez ces souris, l'expression hépatique de certains gènes de la gluconéogenèse est diminuée ce qui suggère une inhibition de la conversion du glycérol en glucose en l'absence de Ppar α . La régulation directe de *Gpdh* (Glycerol 3-Phosphate Dehydrogenase), gène cible de PPAR α , ainsi que de la glycerol kinase, par exemple, est à l'origine de ce mécanisme (Patsouris *et al.*, 2004). De plus, PPAR α contribue à la néoglucogenèse lors du jeûne en induisant l'expression de *PK4* qui inhibe le complexe pyruvate déhydrogénase bloquant ainsi l'oxydation du glucose et donnant lieu à la conversion du pyruvate (Wu, Peters and Harris, 2001). Enfin, PPAR α régule aussi la synthèse du glycogène via Gys-2 (Glycogen synthase 2), l'enzyme limitante de la réaction de stockage de glycogène dans le foie. En conséquence, les souris déficientes pour PPAR α stockent moins efficacement le glycogène que les souris sauvages en période post-prandiale (Mandard *et al.*, 2007).

Cependant, l'hypoglycémie observée chez les souris déficientes pour Ppar α en réponse au jeûne est moins importante lorsque la déficience de Ppar α est restreinte aux hépatocytes ce qui suggère que l'homéostasie du glucose de l'organisme est fortement régulée par Ppar α dans d'autres organes que le foie (Montagner *et al.*, 2016). Dans ce sens, Knauf C et al observent une augmentation de l'expression de Glut4 (Glucose Transporter type 4), un transporteur du glucose, dans le tissu adipeux blanc des souris déficientes pour Ppar α . Cette surexpression s'accompagne d'une augmentation de la masse grasse, de la sensibilité à l'insuline et de la captation de glucose dans le tissu adipeux ce qui n'est pas modifiée lorsque les auteurs restaurent l'expression de Ppar α dans le foie par une infection avec un adénovirus. De plus, l'infusion de WY-14643, un agoniste de Ppar α , dans le cerveau de souris sauvages diminue l'utilisation de glucose par l'organisme. Enfin, la déficience en Ppar α est également associée à une augmentation de l'expression de *Npy* dans le cerveau. Or, *Npy* code pour un polypeptide orexigène connu pour être associé au développement de l'obésité. Ainsi, ces résultats suggèrent que la régulation de l'homéostasie du glucose est majoritairement médiée par PPAR α dans le cerveau (Knauf *et al.*, 2006).

c. Action sur métabolisme des lipides

Le rôle principal de PPAR α dans le foie consiste à réguler le métabolisme des lipides à plusieurs niveaux. Il induit donc la transcription de gènes impliqués dans le transport des lipides, leur utilisation au sein du foie, leur stockage sous forme de gouttelettes, mais aussi d'autres voies annexes comme la cétogenèse. Les principaux gènes cibles de PPAR α sont récapitulés dans le **Tableau 2**.

i. Régulation de l'import et de la fixation des lipides

Avant d'être métabolisés dans le foie, les lipides sont captés et doivent traverser la membrane des hépatocytes. Pour remplir cette fonction, des transporteurs d'acides gras sont présents à la membrane des hépatocytes mais aussi sur la membrane des cellules stellaires et des cellules de Kupffer. Il a été démontré que PPAR α en régule certains dont *CD36* ou *Slc27a1*, 2 et 4 (Solute Carrier 27a 1, 2 et 4). De plus, la fixation de protéine de transport comme les *FABP* (Fatty-Acid Binding Proteins) sur les acides gras favorise leur entrée dans les cellules. Pour finir, il a été montré que *FABP1*, 3 et 4 ou *Fabp1*, 2, 3, et 5 sont des gènes cibles de PPAR α , respectivement dans le foie humain ou murin (Motojima *et al.*, 1998; Rakhshandehroo *et al.*, 2007, 2009).

ii. Régulation de la β -oxydation mitochondriale

Une fois entrés dans la cellule, les acides gras peuvent être oxydés et être utilisés comme source d'énergie dans plusieurs compartiments cellulaires tels que la mitochondrie. PPAR α régule des acteurs des différentes étapes de la β -oxydation mitochondriale.

Tout d'abord l'activation de PPAR α induit l'expression de CPT1, CPT2 ou *Slc25a20* codant pour des protéines impliquées dans l'entrée des acides gras dans la mitochondrie. Ensuite, PPAR α induit l'expression de MCAD (medium-chain acyl-CoA dehydrogenase), SCAD (small-chain acyl-CoA dehydrogenase), LCAD (long-chain acyl-CoA dehydrogenase) et VLCAD (very long-chain acyl-CoA dehydrogenase) conduisant à la formation d'acetyl-CoA au sein de la mitochondrie. Ce substrat peut ensuite soit entrer dans le cycle de Krebs, soit entrer dans la voie de la cétogenèse pour former des corps cétoniques, sources d'énergie pour les tissus périphériques, en situation de jeûne. Cette dernière réaction est catalysée par des protéines régulées par PPAR α comme HMGCS2 (hydroxyméthylglutaryl-CoA synthase 2)(Aoyama *et al.*, 1998; Le May *et al.*, 2000; Rakhshandehroo *et al.*, 2007, 2009).

iii. Régulation de la β -oxydation péroxysomale

Comme énoncé précédemment, la β -oxydation des acides gras dans les hépatocytes peut également se faire au niveau des péroxysomes, mécanisme également contrôlé par PPAR α . En effet, l'activation de PPAR α par ses agonistes, induit l'oxydation des acides gras par les péroxysomes dans les hépatocytes humains et murins via l'expression des gènes codant pour ABCD2 (acyl-CoA ABC transporter D2)(Fourcade *et al.*, 2001), impliqué dans la capture des acides gras par les péroxysomes, ainsi qu'ACOX1 (chez l'humain) ou EHHADH (Enoyl-CoA Hydratase and 3-Hydroxyacyl CoA Dehydrogenase, chez la souris), impliqués dans la catalyse de la réaction de conversion de l'acyl-CoA en acétyl-CoA (Guo *et al.*, 2007; Rakhshandehroo *et al.*, 2007, 2009).

iv. Régulation de l' ω -oxydation microsomale

Les enzymes Cyp4A faisant partie de la famille des cytochromes P450 participent à la catalyse des réactions d' ω -oxydation microsomale. Or, il a été mis en évidence que l'expression des gènes codant pour ces enzymes n'est pas induite chez les souris déficientes pour *Ppara*. PPAR α est donc un régulateur de Cyp4a10, Cyp4a12, et Cyp4a14 chez la souris et de Cyp4a11 chez l'humain. L'expression de ces gènes répond très efficacement à l'activation de PPAR α par ses ligands (Barclay *et al.*, 1999; Yamazaki, Kuromitsu and Tanaka, 2002; Rakhshandehroo *et al.*, 2007, 2009). De plus, il a été démontré dans le foie de rat que l' ω -oxydation des acides gras par les Cyp4a génère des ligands de haute affinité pour PPAR α ce qui suggère une boucle de régulation positive (Cowart *et al.*, 2002).

v. Régulation de la lipogenèse hépatique

Des PPRE ont été identifiés sur les promoteurs de plusieurs gènes impliqués dans la lipogenèse dans le foie de souris comme *Fads2* (Fatty Acid Desaturase)(Tang *et al.*, 2003), *Scd1* (Guillou *et al.*, 2002) ou *Lpin2* (Lipin 2). En effet, l'expression hépatique de ces gènes est induite en réponse à des agonistes de PPAR α chez la souris. Cependant, l'abolition de cet effet chez des souris déficientes pour *Srebp-1* suggère un mécanisme indirect passant par l'activation de SREBP-1c par PPAR α . De plus, certains gènes impliqués dans la synthèse de TG comme *DGAT1* sont aussi induits lorsque PPAR α est activée ce qui suggère un rôle de neutralisation des lipides provenant de la lipolyse du tissu adipeux en réponse au jeûne par PPAR α au sein du foie (Knight *et al.*, 2005; Rakhshandehroo *et al.*, 2007, 2009).

vi. Régulation des gouttelettes lipidiques

Le stockage des lipides dans le foie se fait sous la forme de gouttelettes lipidiques riches en TG dans les hépatocytes et il a été montré que les souris déficientes pour *Ppara* développent

spontanément une stéatose, ce qui n'est pas le cas des souris sauvages. En effet, PPAR α régule des gènes codant pour des lipases, comme PNPLA2 (patatin-like phospholipase domain-containing protein 2) ou LIPE (Lipase E), qui favorisent l'hydrolyse des TG réduisant ainsi le contenu hépatique en gouttelettes lipidiques.

La stabilité des gouttelettes lipidiques est assurée par des protéines associées aux gouttelettes lipidiques, or, certaines de ces protéines sont codées par des gènes cibles de PPAR α . C'est le cas de PLIN2, PLIN5 (Dalen *et al.*, 2006) et FSP27 (Fat Specific Protein 27)(Viswakarma *et al.*, 2007), dont les expressions sont associées au développement de la stéatose hépatique (Rakhshandehroo *et al.*, 2007, 2009).

vii. Régulation des lipoprotéines

Des essais cliniques ont démontré que les fibrates diminuent efficacement la concentration en TG plasmatiques tout en augmentant la concentration en HDL circulantes ce qui indique que PPAR α joue un rôle important dans la sécrétion des lipoprotéines depuis le foie. PPAR α induit l'oxydation des acides gras ce qui a pour conséquence de diminuer la quantité de substrat disponible pour la formation de VLDL riches en TG. Paradoxalement, il a aussi été démontré que PPAR α induit l'expression de MTP (Microsomal Triglyceride Transfer Protein) codant pour une protéine impliquée dans la lipidation d'ApoB100, première étape de la formation des VLDL (Spann *et al.*, 2006).

Au-delà d'agir directement sur les lipoprotéines dans le foie, PPAR α régule aussi la clairance des lipoprotéines riches en TG dans les organes périphériques. L'activation de PPAR α réprime APOC3 (Apolipoprotein C-III)(Hertz, Bishara-Shieban and Bar-Tana, 1995), inhibiteur de la LPL (Lipoprotein Lipase) et active APOA5 (apolipoprotein A5), régulateur positif de la LPL dans le foie et dans le plasma. La LPL favorise alors l'hydrolyse des VLDL et des chylomicrons dans le tissu adipeux et dans le muscle faisant alors diminuer le taux en lipoprotéines circulantes riches en TG (Schultze *et al.*, 2005).

En parallèle, chez l'humain, l'activation de PPAR α est associée à une augmentation de la concentration plasmatique en HDL et ce principalement via l'induction de l'expression d'APOA1 et d'APOA2 (Rakhshandehroo *et al.*, 2010).

viii. Hépatokines

Les hépatocytes sécrètent de nombreux facteurs qualifiés d'hépatokines en réponse au statut nutritionnel ou à des stress divers. La plus étudiée est FGF21 qui est induite en réponse au jeûne et favorise la cétogenèse ainsi que l'oxydation des lipides (Badman *et al.*, 2007). FGF21 est régulée par PPAR α spécifiquement dans les hépatocytes puisque des souris déficientes pour *Ppara* spécifiquement

dans les hépatocytes ne présentent pas d'augmentation de la concentration en Fgf21 dans le plasma en réponse à un jeûne de 20 heures (Smati *et al.*, 2020).

ix. PPAR α dans les hépatocytes

Comme expliqué précédemment, PPAR α est un acteur clé du maintien de l'homéostasie lipidique dans le foie puisqu'il régule de nombreux gènes des différentes voies du métabolisme des lipides. Or, PPAR α qui s'exprime principalement dans les hépatocytes, peut également être exprimée dans d'autres cellules du foie comme les cellules de Kupffer, par exemple. Ainsi, l'étude de souris déficientes pour *Ppara* spécifiquement dans les hépatocytes a révélé que le métabolisme des lipides est principalement modulé par PPAR α dans les hépatocytes. En effet, dans le foie de ces souris, l'expression de gènes associés aux voies métaboliques énoncés précédemment, tels que *Lcad*, *Acox1*, *Hmgcs2*, *Cyp4a10*, *Cyp4a14*, *Plin5* ou *Fsp27*, n'est pas induite en réponse à une activation de *Ppara*. Ainsi, les souris déficientes pour *Ppara* spécifiquement dans les hépatocytes présentent une altération des lipides circulants, de la sécrétion de Fgf21, et elles développent une stéatose spontanée ou au cours de leur vieillissement ainsi qu'une altération du métabolisme du cholestérol (Montagner *et al.*, 2016).

PPAR α est donc un récepteur nucléaire au centre du maintien des équilibres métaboliques principalement dans les hépatocytes. Toutefois, une perturbation de ces mécanismes est observée lors des NAFLD et le rôle de PPAR α est tout autant central dans la prévention et le développement de ces maladies.

	Voie régulée	Gènes
Métabolisme des lipides	Transport des lipides	<i>Cd36, Slc27a1, SLC27A2, SLC27A4, FABP1, FABP3, Fabp2, Fabp5, FABP4</i>
	β -oxydation mitochondriale	<i>CPT1α, CPT2, SLC25A20, MCAD, SCAD, VLCAD, Mcad</i>
	Cétogenèse	<i>HMGCS2, FGF21</i>
	β -oxydation péroxydomale	<i>ABCD2, ACOX1, Ehhadh</i>
	ω -oxydation microsomale	<i>CYP4A10, Cyp4a12, Cyp4a14, CYP4A11</i>
	Lipogenèse	<i>FADS1, Fads2, Scd1, DGAT1</i>
	Gouttelettes lipidiques	<i>PNPLA2, Lipe, PLIN2, PLIN5, FSP27</i>
	Lipoprotéines	<i>APOC3, APOA1, APOA2, APOA5, Mttp</i>
Autres	Inflammation	<i>Il-ra</i>
	Métabolisme glucose/glycérol	<i>Gpdh, Gys-2, PDK4</i>

Tableau 2 : Principaux gènes cibles de PPAR α (adapté de Rakhshandehroo *et al.*, 2010).

Les symboles de chaque gènes sont représentés en majuscule et en gras lorsque la régulation par PPAR α a été démontrée chez la souris et chez l'humain, en majuscule lorsque la regulation n'a été démontré que chez l'humain et en minuscule lorsque la regulation n'a été démontré que chez la souris.

4) PPAR α dans les NAFLD

a. PPAR α joue un rôle protecteur pour le foie

i. PPAR α et la stéatose

L'étude de souris déficientes pour *Ppara* dans tout l'organisme a révélé que ces souris, en particulier les mâles, développent spontanément une stéatose avec l'âge. Cette stéatose est associée à une diminution de l'expression des gènes de l'oxydation des acides gras dans le foie (Costet *et al.*, 1998). Cette observation est confirmée chez des souris déficientes pour *Ppara* spécifiquement dans les hépatocytes (Ppara^{Hep α -/-}). En effet, il a été démontré que les souris Ppara^{Hep α -/-} soumises à un jeûne de 24 heures accumulent plus de lipides hépatiques que les souris contrôles. De plus, l'utilisation d'un régime MCD, induisant la NASH, ou d'un régime riche en graisses, favorisant le développement d'une stéatose, montre que les souris Ppara^{Hep α -/-} développent une stéatose plus importante que les souris contrôles (Montagner *et al.*, 2016). De façon intéressante, ces souris présentent une stéatose moins importante que les souris déficientes pour *Ppara* dans tout l'organisme ce qui indique que l'expression de *Ppara* dans les organes périphériques joue aussi un rôle dans le développement de la stéatose hépatique (Régnier *et al.*, 2020).

Une autre voie de protection contre la stéatose hépatique médiée par PPAR α semble être celle de la VNN1 (Vanin-1) (Rommelaere *et al.*, 2013). La *VNN1* est le gène codant pour l'isoforme 1 de la pantétheinase qui est fortement régulé par PPAR α . La protéine est sécrétée depuis le foie dans la circulation et des patients soumis à un jeûne, activant PPAR α , présentent une augmentation de sa concentration plasmatique. Les auteurs démontrent qu'une déficience de *Vnn1* chez la souris favorise le développement de la stéatose en réponse au jeûne et contribue à l'expression de gènes impliqués dans les voies reliées au stress oxydant et à l'inflammation. Ainsi l'activation de la transcription de *VNN1* par PPAR α protège contre le développement de la stéatose hépatique (Van Diepen *et al.*, 2014).

Ces différentes études démontrent que PPAR α est protecteur contre la stéatose dans le foie majoritairement en favorisant l'oxydation des acides gras. Ce rôle est en partie dû à la présence de PPAR α dans les hépatocytes mais l'expression de PPAR α dans les tissus périphériques contribue à cette protection.

ii. PPAR α et l'inflammation

De par son activité transrépressive, PPAR α exerce une action anti-inflammatoire dans l'organisme. Des études ont donc été menées afin de déterminer si cette action anti-inflammatoire de PPAR α pouvait intervenir dans la prévention de l'inflammation du foie observée au cours du développement de la NASH.

Ainsi, un modèle de souris exprimant un mutant de *Ppara* dépourvue de son domaine de liaison à l'ADN (Ppara $_{\text{DISS}}$) dans le foie a été généré après hydroporation de l'ADNc correspondant dans des souris déficientes pour Ppara α . Ces souris sont incapables d'induire la transcription des gènes cibles de Ppara α impliqués dans l'oxydation des acides gras mais conservent l'activité transrépressive du récepteur nucléaire. Les souris Ppara $_{\text{DISS}}$ ont ensuite été nourries avec un régime MCD induisant la NASH et les auteurs ont observé, dans le foie de ces souris, un développement de l'inflammation modéré comparé aux souris déficientes pour Ppara α . En effet, l'expression de gène de l'inflammation, tels que *Il6* ou *Tnf*, est diminuée dans le foie des souris Ppara $_{\text{DISS}}$ nourries avec le MCD et les auteurs ont démontré que cette diminution est directement associée à la répression des voies AP1 et NF- κ B par PPAR α .

Ces résultats démontrent que l'activité transrépressive de PPAR α contribue à l'hépatoprotection conférée par le récepteur nucléaire et qu'elle prévient le développement de l'inflammation observée lors de la progression de la NASH (Pawlak *et al.*, 2014).

iii. PPAR α et la fibrose

De plus, les souris Ppara $_{\text{DISS}}$ nourries avec le régime MCD développent une fibrose moins avancée que les souris sauvages. En effet, dans le foie de ces souris, une diminution de l'expression des cytokines pro-inflammatoires est observée. Or, l'inflammasome est connu pour stimuler la production de TGF β , un signal pro-fibrogénique. Ainsi, l'action anti-inflammatoire de PPAR α permet également de prévenir le développement de la fibrose hépatique (Pawlak *et al.*, 2014).

Il a également été démontré, plus récemment, dans le foie de patients présentant différents grades de fibrose hépatique que l'expression de PPAR α est inversement corrélée à l'expression de la dermatopontine, un gène impliqué dans le développement de la fibrose. De plus, les auteurs démontrent que l'activation de Ppara α par ses agonistes réprime l'expression de la dermatopontine dans le foie de souris dans différents modèles de NASH et de fibrose. Cette observation est retrouvée dans le foie des souris Ppara $_{\text{DISS}}$ ce qui démontre que la régulation de la dermatopontine par PPAR α dépend de sa fonction transrépressive. Ces résultats démontrent un nouveau mécanisme expliquant l'effet anti-fibrotique de PPAR α via la régulation de la dermatopontine (Lefebvre *et al.*, 2017).

Ces différents résultats démontrent une action protectrice clé de PPAR α contre le développement des différents paramètres de la NASH que sont la stéatose, l'inflammation et la fibrose (**Fig. 20**). Basé sur ces données, l'étude de PPAR α comme cible thérapeutique pour traiter la NASH a été envisagée.

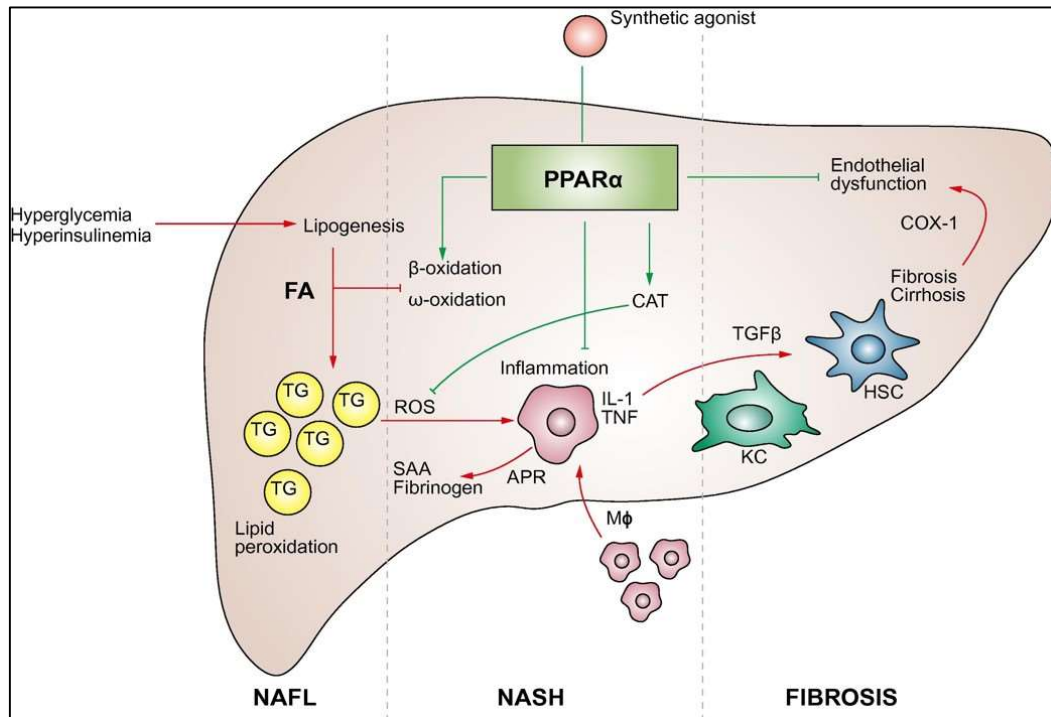


Figure 20 : Rôle hépatoprotecteur de PPAR α lors du développement de la NASH (Pawlak *et al.*, 2015).

b. PPAR α , une cible thérapeutique

Ainsi, PPAR α a été étudié comme une cible thérapeutique pour le traitement de la NASH. Pour ce faire, l'impact d'agonistes sélectifs mais aussi d'agonistes ciblant plusieurs isoformes de PPAR sur le développement de la NASH a été étudié (**Fig. 21**). Les effets de ces différents agonistes sont récapitulés dans le **Tableau 3** ci-dessous.

Agoniste		Effets chez la souris	Effets chez l'humain	Phase d'essai clinique
Mono-agonistes	Fénofibrate	↓stéatose, inflammation ↓gènes de l'inflammation et de la fibrose ↓MDB		
	WY-14643	↓stéatose, inflammation, fibrose ↑sensibilité à l'insuline		
	Pémafibrate	↓stéatose, inflammation, fibrose ↑métabolisme des lipides	↓ASAT/ALAT, cholestérol LDL ↑Elasticité du foie	Phase 2 SPPARMa
Dual-agonistes	Saroglitazar	↓stéatose ↓gènes de l'inflammation et de la fibrose ↓activation des HSC	↓ASAT/ALAT, lipides ↓paramètres histologiques	Phase 3 EVIDENCES II
	Élafibranor	↓stéatose ↓gènes de l'inflammation et de la fibrose	↓Stéatose, inflammation, fibrose Pas de résolution	Phase 3 RESOLVE-IT
Pan-agonistes	Bézafibrate	↓stéatose ↓gènes de l'inflammation et de la fibrose		
	Lanifibranor		↓SAF	Phase 3 NATIVE3

Tableau 3 : Effets des agonistes PPAR α sur les paramètres de la NASH chez l'humain et chez la souris (adaptée de Lucie Bernard, Thèse de Doctorat en Pharmacie, Lille, 2022).

i. Agonistes sélectifs

1. Chez l'animal

L'étude de l'activation de Ppar α sur des modèles précliniques de NASH a débuté par la caractérisation des fibrates. Ces agonistes sélectifs de PPAR α ont initialement été développés pour le traitement des dyslipidémies. En effet, ces composés activent PPAR α ce qui favorise la lipolyse des

lipoprotéines dans les tissus périphériques, la capture des acides gras au niveau du foie, la clairance et la production des lipoprotéines de faible densité et la production des lipoprotéines de haute densité. Cependant, ces molécules se sont avérées efficaces contre d'autres manifestations du syndrome métabolique comme, par exemple, la NASH (Staels *et al.*, 1998).

En effet, l'effet du fénofibrate a été testé sur des souris pour lesquelles le gène murin *ApoE* est remplacé par la version humaine de l'allèle *APOE2*, ayant une affinité réduite pour les LDL (*APO-E2KI*). Ces souris nourries avec un régime riche en graisses de type Western diet développent une inflammation hépatique très précoce caractérisée par une infiltration de macrophages ainsi qu'une stéatose. Les résultats montrent que le traitement des souris *APO-E2KI* avec 0,2% de **fénofibrate** réduit significativement l'infiltration du tissu par les macrophages ainsi que l'expression des gènes pro-inflammatoires et pro-fibrotiques induites par le régime Western diet (Shiri-Sverdlov *et al.*, 2006). L'activation de *Pparα* par le fénofibrate bloque aussi le développement de la stéatose en réponse au régime pour les souris *APO-E2KI* (Lalloyer *et al.*, 2011). De plus, le traitement au fénofibrate prévient la formation de corps de Mallory-Denk (« Mallory-Denk bodies » MDB) dans le foie de souris sauvages traitées avec du DDC. En effet, le traitement au DDC inhibe l'expression de *Pparα* et de ses gènes cibles impliqués dans le métabolisme des lipides. Néanmoins, un traitement au fénofibrate prévient cet effet ainsi que le développement d'agrégats protéiques (MDB) caractéristiques de la souffrance hépatocellulaire (Nikam *et al.*, 2018).

Le traitement des souris *foz/foz* avec un autre fibrate, le **wy-14643** prévient également le développement des dommages hépatocellulaires et de l'inflammation hépatique en réponse à un régime riche en graisses de type « high fat diet ». De plus, le traitement avec le wy-14643 améliore la sensibilité à l'insuline de ces souris (Larter *et al.*, 2012). L'utilisation du wy-14643 sur des souris nourries avec un régime MCD stimule l'oxydation des lipides induite par *Pparα* ce qui réduit la stéatose (Ip *et al.*, 2003) mais aussi l'inflammation et la fibrose hépatique induites par le régime (Ip *et al.*, 2004). De manière intéressante, les souris *Pparα_{DIS}* nourries avec un MCD traitées par cet agoniste sont également protégées contre le développement de l'inflammation et de la fibrose. Ces résultats suggèrent que le rôle anti-inflammatoire et anti-fibrotique du wy-14643 n'est pas dépendant que de la fonction transactivatrice de *PPARα* (Pawlak *et al.*, 2014).

Ainsi, les fibrates activent *PPARα* mais ces agonistes ne sont pas très puissants et les études cliniques ont démontré de nombreux effets secondaires liés à leur utilisation tels que l'élévation des marqueurs de maladies cardiovasculaires (homocystéine), de maladies rénales (créatinine), et de maladies hépatiques (ALT et γ -glutamyl transpeptidase). Une nouvelle génération d'agonistes plus puissants et sélectifs a alors été développée, ils sont qualifiés de **SPPAR α** (Selective *PPARα* modulators)(Fruchart, 2013).

Un de ces SPPAR α est le **pémafibrate** (K-877), qui, administré à des souris db/db nourries avec un régime MCD pendant 4 semaines ou à des souris nourries avec un régime AMLN pendant 20 semaines, limite la progression de la stéatose, de l'inflammation et de la fibrose par rapport à des souris non-traitées. Les résultats montrent que le pémafibrate favorise le métabolisme des lipides de façon plus efficace que le fénofibrate ou le wy-146-43 (Honda *et al.*, 2017; Takei *et al.*, 2017). Cependant, l'effet du pémafibrate dans les foies des souris induit une hépatomégalie et il a été démontré que les femelles répondent mieux au traitement par le pémafibrate que les mâles suggérant un dimorphisme sexuel concernant la réponse à ce composé (Smati *et al.*, 2022).

2. Chez l'humain

Chez l'humain, les fibrates sont utilisés en clinique pour traiter les dyslipidémies et certains ont été testés pour le traitement des NAFLD. C'est le cas du fénofibrate dont l'effet sur la stéatose hépatique a été étudié dans le cadre d'une étude de phase 2 EFFECT I (NCT02354976) sur des patients obèses. Cependant, les résultats ne montrent aucune réduction significative de la stéatose pour ces patients (Oscarsson *et al.*, 2018).

Le pémafibrate a aussi été testé sur des patients atteints de NAFLD dans l'étude PEMA-FL de phase 2 (NCT03350165). Les résultats montrent que le pémafibrate ne diminue pas significativement le contenu hépatique en lipide mais améliore la rigidité hépatique mesurée par élastographie par résonance magnétique du foie. Ces résultats suggèrent une amélioration de la fibrose par le pémafibrate. De plus les patients ayant reçu le pémafibrate présentent une diminution des concentrations plasmatique en ALAT et en LDL-cholestérol (Nakajima *et al.*, 2021). Malgré un arrêt prématuré de l'étude PROMINENT de phase 3 du pémafibrate pour le traitement des accidents cardiovasculaires (NCT03071692), une étude de phase 3 est envisagée pour le pémafibrate dans le cadre du traitement de la NASH.

ii. Dual-agonistes

Le développement des NAFLD est fortement associé à un dysfonctionnement métabolique du foie mais aussi à des organes métaboliques périphériques que sont les tissus adipeux, le muscle ou l'intestin. Or, dans ces tissus et dans le foie, d'autres isoformes de PPAR sont exprimées et exercent un contrôle métabolique fort. De plus, les différents PPAR présentent des similitudes au niveau de leur domaine de liaison au ligand et peuvent être activés parfois par les mêmes ligands. Des molécules ciblant plusieurs isoformes de PPAR ont donc été étudiées pour augmenter l'efficacité des molécules sur les NAFLD.

1. Chez l'animal

Des agonistes ciblant PPAR α et PPAR γ , isoforme favorisant majoritairement le stockage des lipides au niveau du tissu adipeux plutôt qu'au niveau du foie, ou PPAR δ , isoforme ayant des fonctions similaires à PPAR α mais ayant une forte activité anti-inflammatoire dans le foie dans les cellules parenchymateuses et non-parenchymateuses, ont été développés.

C'est le cas du **saroglitazar**, dual agoniste PPAR α/γ , qui protège les hépatocytes contre un stress lipotoxique et favorise la viabilité cellulaire en améliorant la respiration mitochondriale. De plus, le saroglitazar inhibe l'activation des cellules stellaires *in vitro* en bloquant la sécrétion de facteurs pro-inflammatoires. Ces observations faites *in vitro* sont également observées *in vivo* puisque le traitement de souris nourries avec un régime déficient en choline par le dual agoniste réprime l'expression de gènes impliqués dans l'inflammation et la fibrogenèse (Jain *et al.*, 2018). Une autre étude a confirmé ces résultats en administrant le saroglitazar à des souris nourries avec un régime riche en graisses et avec de l'eau sucrée. L'effet bénéfique du saroglitazar dans ce modèle est associé à une activation des gènes cibles de PPAR α et γ dans le foie ainsi qu'à une diminution des gènes pro-inflammatoires et pro-fibrotiques. De plus, le saroglitazar est plus efficace que le fénofibrate ou la pioglitazone, agonistes sélectifs respectifs de PPAR α et γ (Kumar *et al.*, 2020).

Élafibranor (ou GFT505) est un dual agoniste PPAR α/δ qui a démontré des effets bénéfiques sur les différents paramètres de la NASH. En effet, des souris APO-E2KI nourries avec un « Western diet » traitées avec 30mg/kg d'élafibranor développent une stéatose moins importante que les souris non traitées. De plus, l'induction de facteurs pro-inflammatoires et pro-fibrotiques est réduite chez ces souris. Ces résultats sont confirmés chez les souris db/db nourries avec un MCD présentant un phénotype de NASH plus agressif. Chez les souris APO-E2KI déficientes pour PPAR α , le traitement à l'élafibranor prévient en partie la formation de la stéatose en réponse au régime mais il n'a pas d'effet sur les gènes pro-inflammatoires et pro-fibrotiques ce qui suggère que les effets d'élafibranor sur la stéatose sont en majorité dus à PPAR α et l'incidence d'élafibranor sur l'inflammation et la fibrose est principalement due à PPAR δ (Staels *et al.*, 2013).

2. Chez l'humain

Le saroglitazar a été étudié chez des patients atteints de NAFLD dans le cadre de l'étude indienne de phase 2 EVIDENCES I. Les résultats montrent que le dual-agoniste de PPAR α/γ diminue les enzymes hépatiques et les lipides chez les patients atteints de NAFLD. L'étude EVIDENCES II de phase 3 a ensuite été menée sur des patients NASH et a démontré une amélioration des paramètres histologiques. Cette étude a permis l'autorisation de mise sur le marché de la molécule pour le traitement de la NASH en Inde. De plus, l'étude EVIDENCES IV (NCT03863574) de phase 2 menée aux États-Unis (NCT03061721) a démontré que le traitement au saroglitazar diminue les enzymes

hépatiques, le contenu hépatique en lipides, l'insulino-résistance et la dyslipidémie chez des patients atteints de NASH et de NAFLD (Gawrieh *et al.*, 2021). Une étude de phase 2b est en cours sur des patients à des stades avancés de NASH avec fibrose (NCT05011305). Enfin, une étude de phase 3 étudiant l'impact de la combinaison du saroglitazar avec la vitamine E (NCT04193982) est en cours sur des patients atteints de NAFLD et de NASH.

L'élafibranor a fait l'objet d'une étude pilote de phase 2 (NCT 01271777) menée sur patients obèses et a démontré des effets bénéfiques en diminuant les taux de triglycérides, le LDL cholestérol plasmatique mais aussi l'insulino-résistance (Cariou *et al.*, 2013). De plus, l'étude GOLDEN-505 de phase 2 (NCT01694849) menée sur des patients NASH a démontré une amélioration de la stéatose, de l'inflammation, et de la fibrose chez les patients tout en diminuant les risques de maladies cardiovasculaires. Cependant, cette diminution ne permet pas d'atteindre le premier objectif de l'étude qui était la résolution totale de la maladie (Ratziu *et al.*, 2016b). Enfin, une étude de phase 3 appelée RESOLVE-IT (NCT02704403) et menée sur des patients atteints de NASH a été interrompue. En effet, les résultats montrent que le traitement à l'élafibranor ne permet pas de résolution significative des paramètres de NASH par rapport aux patients ayant reçu un placebo.

iii. Pan-agoniste

Enfin, des molécules ciblant toutes les isoformes de PPAR ont été développées et sont qualifiées de pan-agonistes.

1. Chez l'animal

Le **bezafibrate** est un pan agoniste des PPAR et a démontré des effets bénéfiques sur le développement de la NASH. Effectivement, des souris nourries avec un régime MCD et traitées avec le bezafibrate développent une stéatose moins importante que les souris non traitées, ainsi qu'une diminution des gènes pro-inflammatoires et pro-fibrotiques associées à une concentration plasmatique en adiponectine plus élevée. Cependant, les auteurs constatent que les effets du bezafibrate sont comparables à ceux du GW501516, agoniste sélectif de PPAR δ ce qui suggère une forte contribution de cet isoforme (Nagasawa *et al.*, 2006).

Un autre pan-agoniste des PPAR, le **lanifibranor** (ou IVA337), a été étudié sur plusieurs modèles murins de NASH. Le traitement de souris nourries avec un régime déficient en choline et riche en graisses, ou avec un régime de type Western diet, avec le lanifibranor prévient le développement de la stéatose mais aussi de l'inflammation en bloquant l'infiltration des macrophages et des monocytes dans le foie. Les auteurs montrent que les effets du lanifibranor ne se retrouvent pas

totalemment lors de traitements avec des agonistes simples de chaque isoforme de PPAR (Lefere *et al.*, 2020).

2. Chez l'humain

Le traitement au lanifibranor a été étudié en phase 2b lors de l'étude NATIVE (NCT03008070) menée chez des patients atteints de NASH. Les résultats montrent une diminution significative du score SAF d'un minimum de 2 points sans aggravation de la fibrose (Francque *et al.*, 2021). Cette étude est suivie de l'étude NATIVE 3 de phase 3 (NCT04849728) en cours chez des patients atteints d'une NASH avec une fibrose de grade 2 ou 3.

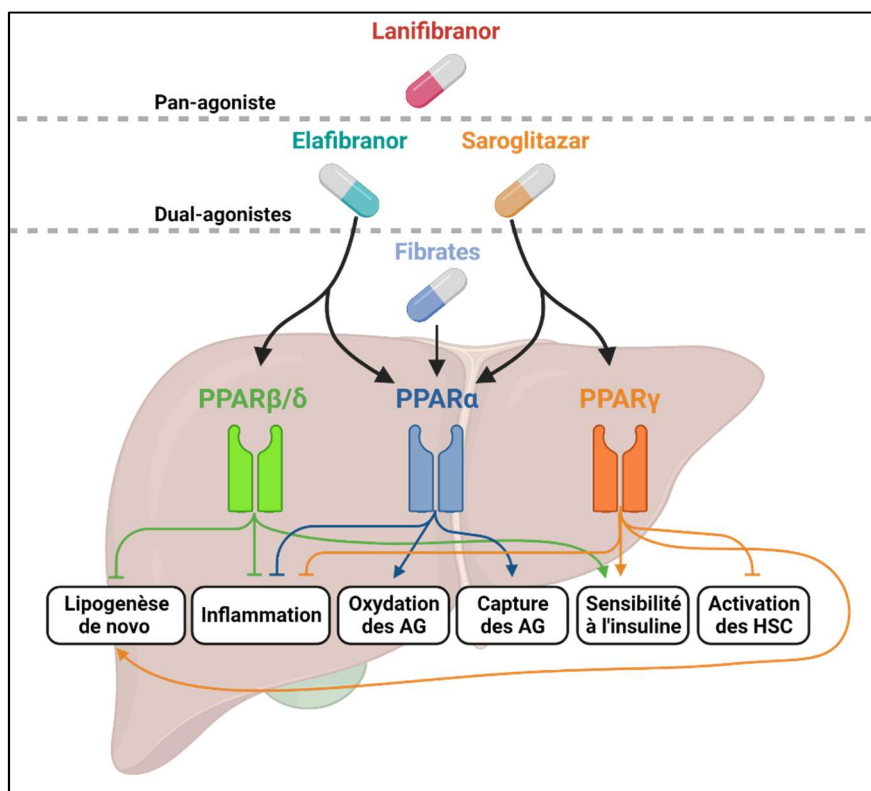


Figure 21 : Effets des agonistes de PPAR α sur les mécanismes à l'origine du développement de la NASH (adaptée de Cariello *et al.*, 2021).

c. Régulation de PPAR α lors de la progression des NAFLD

Ainsi, il semble que certains des agonistes présentés précédemment manquent d'efficacité dans le traitement des NAFLD surtout chez l'humain. Pour mieux comprendre ce phénomène, il est important de comprendre comment PPAR α est exprimée et activée dans le foie lors du développement des NAFLD et de la NASH.

i. Expression dans les modèles précliniques de NAFLD

L'expression de PPAR α est aussi modulée dans le foie des modèles animaux de NAFLD. Il a été démontré que des souris nourries avec un régime déficient en choline et riche en graisses ont une expression réduite de *Ppara*. Cependant, le traitement avec l'agoniste GW7647 prévient cette diminution d'expression et l'effet protecteur du GW7647 est d'autant plus fort lorsque l'agoniste est combiné à la metformine, une molécule utilisée en clinique pour traiter l'IR observée lors d'un DT2 (Okishio *et al.*, 2020). De plus, cette inhibition de l'expression de *Ppara* est aussi observée dans des modèles murins en réponse à des traitements plus agressifs, tels que le traitement au DDC. Il est observé que dès une semaine de traitement au DDC, l'expression de *Ppara* et de ses gènes cibles est diminuée (Nikam *et al.*, 2018).

ii. Expression chez l'humain

Chez l'humain, l'expression de PPAR α a été étudiée sur des cohortes de patients atteints de NAFLD. L'analyse transcriptomique réalisée sur les foies de ces patients montre que l'expression génique de PPAR α est diminuée dans les foies des patients atteints de NASH. De plus, l'expression de PPAR α est corrélée négativement à la sévérité de la maladie mesurée via le NAS score. La comparaison de ces résultats à l'analyse transcriptomique des foies des patients 1 an après un traitement (chirurgie bariatrique ou régime) montre que ce phénomène est réversible. En effet, les patients retrouvant une histologie normale du foie au bout d'un an de traitement présentent des niveaux d'expression de PPAR α dans leurs foies qui augmentent par rapport aux expressions avant traitement. De façon intéressante, la récupération de l'expression de PPAR α après un an de traitement est associée à une augmentation de l'expression de certains de ses gènes cibles suggérant une meilleure activité du récepteur nucléaire (Francque *et al.*, 2015).

d. Mécanismes modulant PPAR α lors du développement des NAFLD

Actuellement, il existe peu d'indices concernant les mécanismes expliquant la diminution de l'expression et de l'activité de PPAR α lors du développement des NAFLD. Dans ce contexte, des miRNA prenant pour cible PPAR α ont été étudiés. Le **miR-10b** a notamment été identifié comme surexprimé dans une lignée d'hépatocytes humains, les cellules L02, accumulant des gouttelettes lipidiques suite à un traitement avec des acides gras. Les auteurs démontrent que miR-10b cible PPAR α et diminue son expression protéique. Toutefois, cette diminution d'expression ne semble pas être associée à une diminution de l'activité transactivatrice du récepteur nucléaire mesurée par un système de gène

rapporteur luciférase dans ces cellules (Zheng *et al.*, 2010). Plus récemment, l'analyse transcriptomique de foies humains a permis d'identifier un miRNA surexprimé chez des patients atteints de NAFLD : **miR-20b**. Dans les foies des patients, une analyse des gènes régulés spécifiquement par les miARN démontre que PPAR α fait partie des cibles de miR-20b. Cette observation est validée *in vitro* dans des lignées d'hépatocytes humains et *in vivo* dans le foie de souris nourries avec un régime riche en graisses pendant 12 semaines et un régime MCD pendant 4 semaines. Les auteurs démontrent également que la diminution de l'expression de miR-20b dans le foie des souris nourries avec un régime riche en graisses pendant 12 semaines prévient le développement de la stéatose en favorisant le métabolisme des lipides dépendant de PPAR α . La même diminution de l'expression de miR-20b dans le foie de souris nourries avec un régime MCD pendant 4 semaines prévient le développement de l'inflammation et de la fibrose. De plus, l'inhibition de miR-20b potentialise l'effet hépatoprotecteur du fénofibrate dans ces modèles murins de NAFLD. Les auteurs démontrent enfin que la surexpression de miR-20b est associée à une diminution de l'expression protéique de PPAR α *in vitro* et *in vivo* ce qui suggère que miR-20b bloque la transcription de PPAR α dans un contexte de NAFLD (Lee *et al.*, 2021).

La recherche de nouveaux régulateurs de PPAR α , rendus actif en condition de NASH, a donné lieu à une étude effectuée sur des souris sauvages et db/db nourries avec un régime MCD. Cette étude a permis d'identifier la protéine **NFATc4** (nuclear factor of activated T-cells 4) comme un régulateur négatif potentiel de PPAR α . En effet, cette protéine est inactive dans le cytoplasme des hépatocytes en conditions physiologiques mais s'active et transloque dans le noyau en condition de NASH. L'activation de NFATc4 est alors associée à une fixation directe de NFATc4 sur PPAR α qui conduit à une inhibition de l'activité du récepteur nucléaire. Ainsi, l'inhibition de NFATc4 dans les modèles murins de NASH prévient la formation de la stéatose, de l'inflammation et de la fibrose. De manière intéressante, l'inhibition de NFATc4 chez des souris déficientes pour Ppar α nourries avec un régime MCD n'a aucun effet sur la stéatose mais prévient le développement de l'inflammation et de la fibrose. Ces résultats suggèrent donc que lors du développement de la NASH, NFATc4 participe à la progression de la stéatose en inhibant l'activité de PPAR α (Du *et al.*, 2020).

De plus, l'implication de **SRSF10** (Serine and Arginine Rich Splicing Factor 10), un facteur d'épissage de l'ARN messager dans la régulation de l'expression de PPAR α a été étudié. SRSF10 est une protéine clé dans le processus d'épissage de l'ARN en intervenant lors de toutes les étapes de maturation de l'ARN. Les auteurs démontrent que SRSF10 interagit avec des facteurs de polyadénylation pour prévenir la fixation des polyadénines sur les introns de certains ARN messagers. Ils démontrent plus particulièrement ce phénomène au niveau des transcrits de PPAR α . Or, dans un contexte de NASH, chez l'humain et la souris, une diminution de l'expression de SRSF10 est observée dans le foie et les auteurs démontrent que l'inhibition de l'expression de SRSF10 *in vitro* et *in vivo*,

diminue l'expression de PPAR α ainsi que le métabolisme des lipides associé. Ainsi, l'inhibition de SRSF10 lors de la NASH semble contribuer à diminuer l'expression de PPAR α (Jobbins *et al.*, 2022).

Ces différents résultats ouvrent des pistes concernant la compréhension des mécanismes impliqués dans la dérégulation de PPAR α lors de la progression de la NASH. Cependant, ces travaux ne permettent pas d'identifier un régulateur pouvant expliquer le manque d'efficacité des agonistes de PPAR α observé chez l'humain.

Partie 4 : Travaux

1) Objectifs

Les NAFLD sont une menace majeure pour la santé publique qui ne cesse de s'accroître avec la propagation de l'épidémie mondiale d'obésité. La recherche de traitements contre les complications du syndrome métabolique, et en particulier la NASH, devient donc cruciale. Dans ce but, l'identification de PPAR α comme facteur clé de la prévention du développement des NAFLD a permis d'en faire une cible thérapeutique de choix pour le traitement de la NASH. Ainsi, des études cliniques ont été réalisées pour tester des agonistes de PPAR α , d'abord sur des modèles pré-cliniques de NASH, puis sur des cohortes de patients atteints de NAFLD. Malheureusement, les effets sur l'humain n'ont pas été suffisamment puissants et n'ont pas permis de résoudre la NASH (essai clinique NCT02704403). Une meilleure compréhension de la régulation de l'expression et de l'activité de PPAR α dans un contexte de NASH est donc nécessaire pour comprendre les résultats décevants de ces agonistes chez l'humain.

De façon intéressante, l'étude de l'expression de PPAR α et de ses gènes cibles dans le foie de patients obèses atteints de NASH comparés aux foies sains a révélé une diminution de l'expression de PPAR α et de ses gènes cibles (Francque *et al.*, 2015). Ces données suggèrent une altération de l'expression et de l'activité hépatique du récepteur nucléaire dans un contexte de NASH. Cependant, les mécanismes régulant l'expression et l'activité de PPAR α lors du développement de la NASH sont très peu étudiés.

Ce projet de thèse a émergé d'une volonté d'explorer les mécanismes à l'origine de la répression de l'expression et de l'activité de PPAR α dans un contexte de NASH. Pour cela, nous avons identifié au sein de l'équipe un gène négativement corrélé à l'expression de PPAR α et à l'expression de ses gènes cibles : *FAT10*. Ce gène code pour une protéine de la famille des ubiquitine-like, surexprimée dans le foie lors d'une inflammation et connue pour moduler l'expression et/ ou l'activité des partenaires avec qui elle interagit (Aichem and Groettrup, 2020).

Ainsi, les principaux objectifs de cette thèse ont été de caractériser l'expression de FAT10 dans plusieurs modèles de NASH puis d'étudier le rôle de FAT10 dans la régulation de l'expression et de l'activité de PPAR α .

2) Matériel et méthodes

a. Tableau des ressources

Le tableau ci-dessous récapitule l'ensemble des outils utilisés lors de la mise en œuvre des expériences de ce projet de thèse. Les sources ainsi que les références permettant d'identifier les réactifs, ligands, médicaments, les modèles cellulaires et animaux, les réactifs de culture cellulaire, d'isolement d'hépatocytes primaires, les virus ainsi que les technologies et kit utilisés sont rassemblés dans ce tableau.

Ressource	Source	Référence
Réactifs, ligands et médicaments		
TNFα : cytokine pro-inflammatoire humaine	eBioscience	BMS301
IFNγ : cytokine pro-inflammatoire humaine	Thermo Scientific	RIFNG50
Tnfα : cytokine pro-inflammatoire murine	eBioscience	410-MT-025
Ifnγ : cytokine pro-inflammatoire murine	eBioscience	485-MI-100
Pémafibrate : agoniste de PPAR α	Toronto Research Medical	P218710
Acide palmitique : acide gras saturé	Sigma-aldrich	P5585
MG132 : inhibiteur du 26S protéasome	Sigma-aldrich	M7449
Bafylomycine A1 (BAF) : inhibiteur de l'autophagie	Sigma-aldrich	SML1661
siFAT10 : siGENOME siRNA - SMARTpool	Dharmacon/ Horizon	M-008266-03-0020
siPPARα : siGENOME siRNA - SMARTpool	Dharmacon/ Horizon	M-003434-01-0020
siCTRL : siGENOME siRNA - SMARTpool	Dharmacon/ Horizon	D-001810-1005
DharmaFECT 1 : transfectant pour siARN	Dharmacon/ Horizon	T-2001-03
Animaux		
Souris C57Bl6/J WT	Laboratoires Charles River	
Souris WT (P16^{+/+}) (littermates)	Élevage U1011 – Institut Pasteur de Lille	
Souris HFHSHC	Haas JT et al, Nat Metab, 2019	
Régimes		
Régime standard : Chow diet (CD)	SAFE diets	A04
Régime contrôle : CSAA	SSNIFF Spezialdiäten GmbH	E15668-04
Régime déficient en choline : CDAA	SSNIFF Spezialdiäten GmbH	E15666-947
Glucose	Sigma-aldrich	G8270
Fructose	Sigma-aldrich	F0127
Méthodes de dosage		
Dosage des ALAT : TGP/ ALAT	ThermoFischer Scientific	MG981769
Dosage des ASAT : TGO/ ASAT	ThermoFischer Scientific	MG981771
Dosage de la glycémie : Glucose GOG FS	Diasys	157819910935
Dosage du β-hydroxybutyrate (β-OH)	ThermoFischer Scientific	MG984325
Dosage des triglycérides : TG reagent	Sigma-aldrich	T2449
Dosage du cholestérol : GCHOLESTEROL	ThermoFischer Scientific	MG981813
Dosage des FFA : NEFA FS	Diasys	125009910026
Dosage du glycérol : Free glycerol reagent	Sigma-aldrich	F6428
Appareil de dosage biochimique	Thermo Scientific	Konelab 20

Dosage de triglycérides hépatiques : Triglycéride Liquicolor test	Interchim	BD3860
Dosage de cholestérol hépatique : Cholestérol Liquicolor test	Interchim	AL2250
Culture cellulaire		
PBS	Gibco	14190-094
Sérum de veau foetal (SVF)	Eurobio	CVFSVF00-01
Minimum essential medium (MEM)	Gibco	11095080
MEM non-essential amino-acids (NEAA)	Gibco	11140035
Sodium pyruvate	Gibco	11360070
William's E medium	Gibco	22551022
Insuline bovine	Sigma-aldrich	I5500
Dexaméthasone	Sigma-aldrich	D1756
Trypsine	Gibco	25300-054
HBSS (Hank's Balanced Salt Solution)	Gibco	14170-088
Collagène	Roche	11179179001
Gélatine	Sigma-aldrich	G1890
Isolement d'hépatocytes primaires		
EGTA	Sigma-aldrich	E3889
HEPES	Sigma-aldrich	H4034
Collagénase	Sigma-aldrich	C5138
Lignées cellulaires		
HepG2 : hépatocytes humains cancéreux	ATCC	HB-8065
IHH : hépatocytes humains immortalisés	Shippers IJ et al, Cell Biol Toxicol, 1997	
Virus		
Lentivirus FAT10	Origène	RC204431L4V
Lentivirus CTRL	Origène	PS100093V
Adénovirus FAT10	Genecust	
Adénovirus CTRL	Genecust	
Technologie Seahorse		
Analyseur Seahorse	Seahorse Bioscience	XFe24
Microplaques 24 puits : XFe24 V7	Seahorse Bioscience	102601-100
Milieu de base	Seahorse Bioscience	103335-100
Seahorse XF Cell Mito Stress Test Kit	Seahorse Bioscience	103708-100
Extraction d'ARN et RT qPCR		
TRIzol RNA Isolation Reagent	Thermo Scientific	15596026
RNeasy Lipid Tissue Mini kit : extraction sur colonne	Quiagen	74804
DNase	Thermo Scientific	EN0521
RT : High capacity Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems	4368814
qPCR SYBR : Low ROX SYBR Master Mix dTT blue	Takyon	UF-LSMT-B0701
qPCR Taqman : TaqMan multiplex Master Mix	Applied Biosystems	4461882
Extraction de protéine, Western Blot et Co-immunoprécipitation (Co-IP)		
Dosage de protéine : Pierce BCA Protein Assay Kit	ThermoFischer Scientific	PI23225
Substrat chimiluminescent : SuperSignal West Dura Kit	ThermoFischer Scientific	10398773
Co-IP : Pierce Crosslink Magnetic IP/Co-IP Kit	ThermoFischer Scientific	88805

Conversion de l'ARN total pour les puces à ADN : Clariom S Mouse	Applied Biosystems	902930
Marquage et immunomarquage		
Hématoxyline	Sigma-aldrich	HHS128
Eosine	Sigma-aldrich	HT1101128
Clearène	Leica	3803600E
Xylène	Carlo Erba	492301
Gelatine de porc	Sigma-aldrich	G1890
Alun de chrome	Sigma-aldrich	243361
Poly-L-lysine	Sigma-aldrich	P4707-50ML
NucBlue : marqueur fluorescent des noyaux cellulaires	Invitrogen	2303553
BODIPY	Molecular Probes	D3922
Marquage FAT10 : Alexa Fluor 488 Tyramide SuperBoost Kit, goat anti-rabbit	Invitrogen	B40922
Marquage FAT10 : Alexa Fluor 594 Tyramide SuperBoost Kit, goat anti-rabbit	Invitrogen	B40925
Sondes Duolink PLA mouse	Sigma-aldrich	DUO92004
Sondes Duolink PLA rabbit	Sigma-aldrich	DUO92002
Réactif Duolink de détection en fluorescence rouge	Sigma-aldrich	DUO92008
Réactif Duolink de détection lumière visible	Sigma-aldrich	DUO92012
Milieu de montage hydrophile : pour la fluorescence	Dako	53023
Milieu de montage hydrophobe : pour la lumière blanche, Eukitt	Fluka	03889
Automate de déshydratation	Myr	STP 120
Microtome	Leica	RM2255
Automate de coloration	Leica	Autostainer XL
Chambre de démasquage	Biocare	Decloaking chamber
Tampon de démasquage : Diva decloaker 10X	Biocare	DV2004
Microscope confocal : LSM700	Zeiss	
Microscope confocal avec « spinning disk »	Zeiss	
Scanner de lame : Axioscan	Zeiss	

Tableau 4 : Tableau des ressources utilisées lors de la thèse.

b. Cohorte humaine

La collaboration avec les Pr. Sven Francque et Pr. Luc Van Gaal à l'hôpital d'Anvers a permis d'obtenir des données et des échantillons d'une large cohorte de patients obèses : la cohorte RESOLVE. Les patients composant la cohorte sont tous obèses ($IMC > 30 \text{ kg/m}^2$) ou en surpoids ($25 \text{ kg/m}^2 < IMC < 30 \text{ kg/m}^2$) et ils ont subi une biopsie hépatique afin d'établir le score histologique NAS. Les patients ayant été diagnostiqués atteints de NASH ont alors été soumis soit à un régime, soit à une

chirurgie bariatrique dans le but de perdre du poids. Après un an de traitement, des nouvelles biopsies hépatiques ont été prélevées sur ces patients.

La collaboration a permis d'obtenir les données transcriptomiques issus de ces patients ainsi que leur IMC et leurs scores histologiques, notamment. Ces informations ont permis de séparer les patients en deux groupes : NASH (N=129) avec un score de stéatose S>1, un score d'inflammation I>1 et un score de ballonnisation B>1, et no NASH (N=76). Les mêmes données ont pu être collectées après un an de traitement par chirurgie bariatrique (N=28) ou par régime (N=32). Les analyses transcriptomiques sont détaillées ci-après.

Des biopsies de patients ont également été conservées pour réaliser des coupes en paraffines. La collaboration a permis d'obtenir des coupes de patients sains (N=5 avec S, B et I=0) et de patients atteints de NASH (N=10 avec S>1, I>1 et B>2) qui ont été immunomarquées comme décrit ci-après. Les images choisies pour illustrer ces marquages sont représentatives de chaque groupe de patients.

c. Modèles animaux

L'ensemble des souris utilisées lors de nos protocoles sont des mâles, C57Bl6/J (« wild-type » (WT) ou p16^{+/+} ayant le même phénotype). L'hébergement des animaux a été réalisé à température contrôlée (21-24°C) sur un cycle 12 heures/12 heures, jour/nuit. Sauf indication contraire, les souris avaient accès à la nourriture et à l'eau *ad libitum* et elles étaient nourries avec un régime standard de type Chow diet (CD). Pour toutes les expériences, les souris ont été réparties aléatoirement dans les groupes selon leur âge et leur poids. Les différents protocoles de ce projet de thèse ont été approuvés et réalisés conformément aux directives du comité d'éthique de l'Institut Pasteur de Lille (n° d'agrément A59-35-0009).

À la fin des différents protocoles (excepté les isollements de cellules primaires), le prélèvement de sang a été réalisé en rétro-orbitaire dans un tube contenant de l'EDTA (Starsted) puis les souris ont été mises à mort par dislocation cervicale. Ensuite, le foie, les tissus adipeux blancs, et la rate ont été rapidement prélevés et pesés. Par la suite, un morceau du lobe latéral gauche des foies prélevés a été placé dans une cassette d'inclusion pour chaque souris et plongé dans une solution à 4% de paraformaldéhyde (PAF), le reste du foie et des organes ont été immédiatement congelés dans l'azote liquide. Les tissus ont alors été conservés à -80°C, le sang et la PAF contenant les cassettes d'inclusion à 4°C et jusqu'aux analyses ultérieures.

Les différents modèles murins mis en place sont les suivants :

i. But de l'étude : Caractérisation de l'expression de Fat10 dans un modèle de NASH induite par un régime *in vivo*

Des souris âgées de 8 à 12 semaines ont été nourries avec un régime semi-synthétique « Choline-deficient L-amino acids-defined » (CDAA) composé de 11% de protéines, de 31% de graisse, de 58% de carbohydrates, enrichit avec 1% de cholestérol et avec une eau de boisson contenant 55% de fructose (23,1g/L) et 45% de glucose (18,9g/L). Les souris contrôles ont été nourries avec le régime « Choline-supplemented L-amino acids-defined » (CSAA) composé de 12% de protéines, de 16% de graisse, de 72% de carbohydrates et avec une eau de boisson normale. Ce régime étant connu pour induire une souillure accrue de la litière, les souris ont été hébergées par groupe de 4 et la litière a été changée 2 fois par semaine comme conseillé par le fournisseur.

Les souris ont été exposées à ces régimes pendant 2 semaines (CDAA : N=6 WT ; CSAA : N=7 WT) ou 5 semaines (CDAA : N=7 p16^{+/+} ; CSAA : N=6 p16^{+/+}).

ii. But de l'étude : Caractérisation de la surexpression de Fat10 dans les hépatocytes primaires murins et la fraction non-parenchymateuse

Des souris WT âgées de 8 à 12 semaines nourries avec le CD (N=2), le CSAA (N=3) ou le CDAA (N=3) pendant 2 semaines ont été anesthésiées par une injection intrapéritonéale de kétamine/xylazine. Une perfusion a ensuite été réalisée par la veine cave afin de faire circuler une solution d'HBSS contenant 50mM d'HEPES (acide 4-(2-Hydroxyéthyl)-1-Pipérazine Éthane Sulfonique) et 167mM d'EGTA (Éthylène Glycol-bis(β-aminoéthyl éther)-N,N,N',N'-Tétracetic Acid), pH=8 dans le foie pour le laver. Par la suite, une solution d'HBSS contenant 50mM d'HEPES, 0,5mM de CaCl₂·2H₂O et 0,025% de collagénase type IV, pH=7,4 est perfusée dans les foies jusqu'à ce que leur structure se dissocie. Les foies sont alors récupérés puis désagrégés dans la solution de lavage. Les homogénats sont passés sur un filtre de 70µm.

D'une part, pour les hépatocytes isolés à partir des foies des souris nourries avec le CD, les homogénats sont centrifugés pendant 2 minutes à 400rpm. Le culot de cellules est lavé 3 fois et resuspendu dans le milieu de culture des hépatocytes primaires composé de milieu William's E contenant 1% de glutamine, 0,1% de BSA (albumine sérique bovine), 100nM de dexaméthasone, 1% de pénicilline/streptavidine. Une cellule de Malassez a été utilisée pour compter les hépatocytes isolés et mesurer leur viabilité à l'aide de bleu de Trypan. Par la suite, 100 000 hépatocytes primaires ont étéensemencés dans des plaques 12 puits préalablement recouvertes d'une couche de collagène (avec 0,1% d'acide acétique) pour faciliter l'adhérence des cellules. 2 heures après l'ensemencement, le milieu de culture est changé afin d'éliminer les éventuelles cellules n'ayant pas adhéré. Le lendemain, les cellules ont été traitées par le milieu de culture contenant 50ng/mL de Tnfα et 10ng/mL d'Ifnγ pendant 0, 2, 8, 24 et 48 heures puis récupérées pour des analyses de RT qPCR.

D'autre part, les homogénats issus des foies des souris nourries avec le CSAA et le CDAA ont été centrifugés à 20g pendant 5 minutes. Le culot, enrichi en hépatocytes, a été lavé puis centrifugé pendant 5 minutes à 400g, et ce, 2 fois. La fraction ainsi obtenue est alors fortement enrichie en hépatocytes primaires et est resuspendue dans le milieu de culture. Les cellules ont ensuite été comptées à l'aide de la cellule de Malassez, comme précédemment. Les surnageants récupérés à chacune des étapes précédentes sont rassemblés puis centrifugés 3 fois à 300g pendant 5 minutes, le culot est éliminé à chaque lavage. La fraction ainsi obtenue est enrichie en cellules non-parenchymateuses en suspension qui sont comptées à l'aide de la cellule de Malassez. Les deux fractions, celle composée d'hépatocytes primaires (HP) et celle composée de cellules non-parenchymateuses (NPC), ont alors été récupérées directement pour extraire l'ARN en vue d'analyses transcriptomiques et par RT qPCR.

iii. But de l'étude : Exploration de l'impact de la surexpression hépatique de Fat10 sur l'expression et l'activité de Ppar α en réponse au jeûne ou à un traitement au pémafibrate *in vivo*

Des souris WT âgées de 8 à 12 semaines ont été injectées avec 100 μ L d'une solution saline contenant 2,5.10⁸ GC/mL d'adénovirus contrôle (Ad-CTRL, N=35) ou d'adénovirus FAT10 (Ad-FAT10, N=35). Les injections ont été réalisées dans la veine de la queue. 4 jours après l'infection, les souris ont été séparées en deux groupes pour lesquels l'activité de Ppar α a été stimulée différemment.

D'une part, certaines souris ont été mises à jeun (Ad-CTRL, N=10 et Ad-FAT10, N=10) ou nourries *ad libitum* (Ad-CTRL, N=10 et Ad-FAT10, N=10) pendant 18 heures puis mises à mort le 5^{ème} jour d'infection.

D'autre part, le soir du 4^{ème} jour d'infection, certaines souris ont été gavées oralement avec une solution de CMC (carboxyméthylcellulose) à 1% (Ad-CTRL, N=5 et Ad-FAT10, N=6) ou une solution de CMC à 1% contenant du pémafibrate (1mpk ; Ad-CTRL, N=6 et Ad-FAT10, N=5). Le 5^{ème} jour d'infection, 18 heures plus tard, le traitement a été répété de la même façon et toutes les souris ont été mises à jeun pendant 5 heures avant d'être mises à mort.

iv. Histologie

1. Fixation, inclusion et coupe de foie

Les échantillons destinés aux analyses histologiques sont placés dans un automate de déshydratation au bout de 24 heures de fixation dans la solution de PAF à 4°C. L'automate a alors plongé les échantillons successivement dans deux bains d'éthanol 70% pendant 45 minutes, puis dans

deux bains d'éthanol 96%, puis dans trois bains d'éthanol 100%, puis dans deux bains de xylène et enfin dans deux bains de paraffine chauffée à 60°C. Les échantillons ont été récupérés puis inclus dans des blocs de paraffine qui ont, par la suite, été utilisés pour obtenir des coupes de 3µm d'épaisseur à l'aide d'un microtome. Ces coupes ont été fixées sur des lames préalablement gélatinées avec une solution contenant 5g/L de gélatine et 4g/L d'alun de chrome afin d'être marquées.

2. Marquage hématoxyline et éosine (H&E)

La coloration des coupes de foies avec l'hématoxyline et l'éosine a été faite à l'aide d'un automate de coloration. Les coupes ont d'abord été réhydratées en étant successivement plongées dans 2 bains de Clearène pendant 5 minutes puis dans un bain d'éthanol 100% et enfin dans deux bains d'eau distillée pendant 2 minutes. Les coupes ont ensuite été colorées dans un bain d'hématoxyline pure pendant 3 minutes, puis lavées dans un bain d'eau distillée pendant 2 minutes et dans un bain d'éthanol 70% contenant 0,001% d'HCl pendant 6 secondes. Les coupes ont ensuite été plongées dans un bain d'éthanol 96% pour être déshydratées avant d'être colorées dans un bain d'éosine pendant 2 minutes. Enfin, la déshydratation des coupes est achevée par des bains successifs d'éthanol 96% pendant 2 min, d'éthanol 100% pendant 1 minute, puis de xylène pendant 1 minute. Le montage des lames ainsi marquées a été réalisé après évaporation totale du xylène avec un milieu de montage hydrophobe. Les lames ont enfin été prises en photo par un scanner de lame (Axioscan - Zeiss) permettant d'obtenir une image globale de la coupe sur laquelle il est possible de zoomer jusqu'à obtenir une résolution équivalente à un objectif 20X.

3. Établissement des scores histologiques

- **Stéatose** :

Les scans de chaque coupe ont été analysés grâce à une macro réalisée en collaboration avec la plateforme d'imagerie cellulaire (Plateformes Lilloises en Biologie et Santé (PLBS) - UAR 2014 - US 41, Antonino Bongiovanni) pour déterminer le score de stéatose. La macro est codée en langage Javascript sur le logiciel Fiji. Pour chaque image analysée, la macro détecte la surface occupée par des zones vides représentant la position des gouttelettes lipidiques. Le pourcentage de stéatose est ainsi calculé par rapport à la surface totale de la coupe. Les scores sont ensuite attribués conformément au **Tableau 4**.

- **Inflammation** :

Pour chaque coupe, la détermination du score d'inflammation a nécessité l'observation aléatoire de 10 champs au grossissement 20X. Sur chacun des champs, les foyers inflammatoires (amas de petites cellules ayant des noyaux condensés) ont été dénombrés. La moyenne du nombre de foyers

inflammatoires observés sur les 10 champs d'une coupe a été calculée et associée au score correspondant (**Tableau 4**).

- **Ballonisation :**

Les scans de chaque coupe ont été parcourus aléatoirement afin de détecter les cellules ballonisées. Ces cellules se caractérisent par un cytoplasme élargi (au moins 2 fois plus gros que celui d'un hépatocyte normal), blanchi et opaque avec un noyau central qui est légèrement plus petit qu'un hépatocyte normal. Le score de ballonisation est attribué en fonction du nombre de cellules observées sur l'ensemble de la coupe comme décrit dans le **Tableau 5** (Puri and Sanyal, 2012).

Stéatose	
Degré (% surface)	Score
<5%	0
5-33%	1
33-66%	2
>66%	3
Inflammation	
Nombre de foyers inflammatoires	Score
Néant	0
<2	1
2 à 4	2
>4	3
Ballonisation	
Nombre de cellules ballonisées	Score
Néant	0
Quelques cellules	1
Beaucoup de cellules	2

Tableau 5 : Détermination des scores histologique lors du diagnostic de NASH (d'après Puri and Sanyal, 2012).

v. Dosages biochimiques

1. Dosage de lipides hépatiques

Le dosage des lipides contenus dans le foie a été effectué de la façon suivante : après avoir broyé les foies dans du PBS 1X en respectant 100mg de foie pour 1mL de PBS, 100µL de broyat a été dilué avec 400µL d'eau distillée dans un tube en verre. Le reste a été conservé à -20°C pour doser les protéines ultérieurement. À ce mélange a été ajouté 2mL d'une solution méthanol : chloroforme (2 : 1) puis les échantillons ont été mélangés vigoureusement et centrifugés 5 minutes à 1000rpm afin de séparer les phases organique et aqueuse. 1mL de phase organique a ensuite été transféré dans un nouveau tube en verre pour chaque échantillon à l'aide d'une seringue Hamilton. Les phases organiques ont ensuite été mises à évaporer sous un flux d'azote puis les culots obtenus ont été resuspendus dans 1mL d'une solution de chloroforme contenant 1% de triton X100 pour être évaporés à nouveau. 100µL d'eau ont ensuite été ajoutés aux culots puis les solutions obtenues ont été chauffées à 37°C afin de favoriser la solubilisation des lipides. Le dosage des TG et du cholestérol hépatique a enfin été réalisé à l'aide des kits de dosages colorimétrique (Interchim). Les résultats représentés sont la quantité de lipides normalisée par rapport à la quantité de protéines ou par rapport à la masse de l'échantillon broyé pour effectuer le dosage.

2. Dosage biochimique des paramètres circulants

Des dosages biochimiques ont été effectués sur les plasmas obtenus après centrifugation du sang prélevé chez les souris à 4500rpm pendant 10 minutes à 4°C. Les plasmas ont alors été collectés dans des tubes eppendorfs puis un volume d'au moins 50µL a été transféré dans des godets adaptés à l'appareil de dosage Konelab 20 (Thermo Scientific). Après calibration, l'appareil a dosé par photométrie les protéines ainsi que les ALAT et ASAT, le cholestérol, le glycérol, les TG totaux, les acides gras circulants, le β -OH et la glycémie de manière automatisée. Les résultats obtenus informatiquement donnent les concentrations des différents paramètres mesurés. Pour les TG, la concentration en « TG vrais » est représentée et est obtenue en soustrayant la concentration en glycérol à la concentration en TG totaux.

d. Analyse transcriptomique

L'utilisation des puces Affymetrix ainsi que l'analyse des données ont été réalisées en collaboration avec l'équipe 4 du l'UMR1011 sur le plateau Affymetrix géré par le laboratoire.

i. Puces à ADN (Affymetrix)

Les échantillons d'ARN destinés aux analyses transcriptomiques extraits et passés au Bioanalyzer comme décrit précédemment ont permis la synthèse d'ARNc à l'aide d'un kit. La

purification de ces ARNc a été effectuée à l'aide de billes magnétiques puis ces ARNc ont été dosés. Un nouveau kit a été utilisé pour obtenir les ADN complémentaires simple brin (ADNssc) à partir de ces ARNc. Après purification et dosage, les ADNssc ont été fragmentés puis hybridés sur les puces à ADN. Les puces ont ensuite été scannées par l'appareil Genechip Scanner 7000G (Thermo Scientific) et les données transcriptomiques ont été obtenues informatiquement (.CEL). Le numéro d'accèsion pour les données de puces sur la base de données Gene Expression Omnibus (GEO) est GSE212617.

ii. Analyse bioinformatique des données

La normalisation (Net Afx Annotation Release 36, July 2016) des données puis l'analyse bioinformatique ont été réalisées grâce au module GIANT élaboré sur le logiciel Galaxy par l'équipe 4 de l'UMR1011 (Vandel, Gheeraert, *et al.*, 2020). L'analyse des « Gene Ontology pathways » a été réalisée à l'aide du logiciel Metascape.

e. Lignées cellulaires

i. Culture cellulaire

Les cellules HepG2 ont été cultivées dans un milieu MEM contenant 10% de SVF, des acides aminés non-essentiels et du sodium pyruvate. Les cellules IHH ont été cultivées dans un milieu William's E contenant 10% de SVF, 20 mU/mL d'insuline bovine et 50nM de dexaméthasone. Les IHH ont étéensemencées dans des plaques de culture préalablement recouvertes d'une couche de gélatine afin de faciliter l'adhérence des cellules. Les deux lignées ont été cultivées dans un incubateur permettant le maintien d'une atmosphère humide, d'une température de 37°C et de 5% de CO₂ et étaient passées dès qu'elles atteignaient 80% de confluence.

ii. Surexpression de FAT10

1. Endogène

Les cellules HepG2 et IHH ont été cultivées avec leur milieu de culture respectifs auxquels ont été ajoutés 50ng/mL de TNF α et 10ng/mL d'IFN γ pendant 0, 2, 4, 8, 24 et 48 heures afin d'induire la surexpression endogène de FAT10.

2. Exogène

Lors de ce projet de thèse un modèle *in vitro* de surexpression stable de FAT10 a été généré. Pour cela, les cellules HepG2 ont été cultivées pendant 24 heures avec leur milieu de culture habituel contenant plusieurs doses (50, 100, et 200 MOI) de lentivirus et en présence de polybrène. Deux lentivirus ont été utilisés pour infecter les cellules : un premier lentivirus vecteur d'un plasmide contrôle contenant le gène d'expression de la GFP (Green Fluorescent Protein ; lentiCTRL) ou un deuxième lentivirus vecteur d'un plasmide de surexpression de FAT10 étiqueté avec les motifs Myk et DDK (lentiFAT10). Les plasmides utilisés contiennent également un gène de résistance à la puromycine. La sélection des cellules infectées a été effectuée par l'ajout 0,5µM de puromycine au milieu de culture pendant 10 jours. Lors de cette période, le milieu de culture enrichi en puromycine est renouvelé toutes les 48 heures. Au terme de cette période de sélection, les lignées de surexpression stable de FAT10 (HepG2-FAT10) et contrôle (HepG2-FAT10) sont obtenues et amplifiées de façon non-clonale.

iii. Inhibition de l'expression de FAT10 et de PPAR α

Les cellules HepG2 ont été transfectées avec les siARN contrôle (siCTRL), ciblant FAT10 (siFAT10) et/ou PPAR α (siPPAR α) (smartpool de plusieurs séquences de siARN voir le **Tableau 6**) à l'aide de DharmaFECT selon les instructions du fournisseur. Après 24 heures de transfection, le milieu de culture a été renouvelé. Après 48 heures de transfection, les cellules sont traitées avec les cytokines pro-inflammatoires, comme indiqué précédemment.

Gène ciblé	Séquence cibles Dharmacon Smartpool (5'→3')
FAT10	GAGACUAAGACGGGUAAUAA
	GAUCUAAAAGCCACGGAGA
	CAAAGAACAUGUCCGGUCU
	GUGCGAAGGUCCAGCUCAG
PPAR α	UCACGGAGCUCACGGAAUU
	GAACAUGACAUAGAAGAUU
	GGAUAGUUCUGGAAGCUUU
	GACUCAAGCUGGUGUAUGA

Tableau 6 : Séquences cibles des siARN utilisés lors de la thèse.

iv. Activation de PPAR α par déprivation du milieu de culture et/ ou traitement au pémafibrate

Dans le but d'induire l'activité de PPAR α , les cellules ont été placées dans un milieu de culture déprivé en lipides. Pour cela, les cellules ont étéensemencées dans des plaques de culture cellulaire puis le milieu de culture des cellules a été remplacé par le même milieu dans lequel le SVF n'a pas été

ajouté (0% SVF). 24 heures plus tard, le milieu de culture des cellules est remplacé par un milieu contenant une faible concentration de sérum (0,1% SVF), les cellules ont été récupérées le lendemain. Pour les expériences étudiant l'impact de l'expression de FAT10 sur l'activité de PPAR α en réponse à son agoniste, le milieu 0,1% de SVF a été supplémenté avec du pémafibrate (1 μ M pour les HepG2 sauvages, 100nM pour les HepG2-CTRL et HepG2-FAT10) ou le DMSO (Diméthylsulfoxyde). Le lendemain, les cellules sont récupérées pour les analyses ultérieures.

v. Tests fonctionnels

1. BODIPY

Les cellules ont étéensemencées à une densité de 50 000 cellules sur des lamelles de verres préalablement recouvertes d'une couche de poly-L-lysine (Sigma-aldrich) dans des plaques 12 puits. Les traitements et transfections nécessaires à la modulation des expressions de FAT10 et de PPAR α ont été réalisés comme décrit précédemment. Après 3 lavages de 5 minutes avec du PBS 1X, les cellules ont été fixées par une solution de PAF à 2% contenant 0,2% de glutaraldéhyde pendant 10 minutes sur glace. La PAF a ensuite été éliminée par 3 lavages de 5 minutes avec du PBS 1X puis les cellules ont été incubées à l'abri de la lumière avec une solution de PBS 1X contenant 1 μ g/ μ L de BODIPY et du NucBlue pendant 20 minutes à température ambiante sous agitation. Les lamelles de verre ont ensuite été lavées 2 fois 5 minutes avec du PBS 1X, 1 fois 5 minutes dans l'eau milliQ à l'abri de la lumière puis montées sur des lames à l'aide du milieu de montage hydrophile. Une fois les lames sèches, la fluorescence a été mesurée au microscope confocal LSM700 (Zeiss) avec les objectifs 20X et 40X (milieu d'immersion : huile) et les fluorescences du BODIPY et du NucBlue ont été acquises à l'aide des lasers à argon 488nm et UV. Enfin, le nombre de gouttelettes lipidiques détectées par le BODIPY pour chaque cellule a été quantifié à l'aide du module « Spot Detection » du logiciel de traitement d'image en « open source » Icy.

2. Seahorse

70 000 cellules ont étéensemencées dans chaque puits d'une plaque de culture cellulaire destinée aux mesures par la technologie Seahorse avec l'appareil XFe24 dans leur milieu de culture habituel, décrit précédemment. Les traitements et transfections nécessaires à la modulation des expressions de FAT10 et de PPAR α ont été réalisés comme décrit précédemment. Avant la mesure, les cellules sont placées dans le milieu Seahorse supplémenté avec 200mM de glutamine, 10mM de glucose et 1mM de pyruvate puis incubées dans une étuve à 37°C sans CO₂ pendant 1 heure. La fonction mitochondriale a ensuite été mesurée avec le kit « MitoStress Test » par l'ajout successif d'oligomycine (16 minutes, 2 μ M), un inhibiteur de l'ATP synthase, de FCCP (40 minutes, 1 μ M), un

découpleur de mitochondries, et de roténone/ antimycine A (64 minutes, 0,5µM), inhibiteurs spécifique des complexes I et III de la chaîne respiratoire, au milieu des cellules. Les valeurs mesurées témoignent de la consommation d'oxygène (« oxygen consumption rate », OCR) des cellules et sont exprimées en pmol d'O₂ par minute. Les valeurs représentées sont l'OCR normalisée par la concentration en protéine obtenue par un dosage avec le kit BCA.

f. Extraction et quantification de l'ARNm par RT qPCR

Les ARN totaux ont été extraits à partir des cellules ou des tissus avec le réactif TRIzol selon les instructions du fabricant puis dosés sur le Nanodrop One (Thermo Scientific). Les ARN totaux destinés aux analyses transcriptomiques ont été isolés par une extraction sur colonne à l'aide du kit RNeasy Lipid Tissue (Quiagen) puis leur qualité a été vérifiée sur le Bioanalyseur 2100 (Agilent).

Pour les ARN issus de tissus et destinés aux analyses par qPCR, une étape de traitement à la DNase a été effectuée. La rétro-transcription d'1 µg des ARN totaux issus des cellules et des tissus en ADNc (ADN complémentaire) a ensuite été réalisée. Des qPCR en temps réel ont été faites pour déterminer l'expression relative en ARNm dans les échantillons. La technologie TaqMan a été utilisée pour déterminer l'expression de *FAT10* dans les échantillons humains et murins et les expressions des autres gènes étudiés ont été mesurées en utilisant la technologie SYBR Green. Les références des sondes TaqMan ainsi que les séquences des amorces utilisées sont décrites dans le **Tableau 7**. L'appareil QuantStudio 3 (Applied Biosystems) a été utilisé pour réaliser ces qPCR en temps réel et les résultats ont été analysés à l'aide du logiciel « QuantStudio Design & Analysis Software » (Applied Biosystems). Les résultats obtenus grâce à ces techniques sont les expressions relatives obtenues par la méthode ddCt normalisée par rapport à la cyclophiline, pour la technologie SYBR Green, et par rapport à l'actine, pour la technologie TaqMan.

Gène	Séquence	
Humain		
<i>Cyclophiline</i>	Sens	GCATACGGGTCCTGGCATCTTGTC
	Antisens	ATGGTGATCTTCTTGCTGGTCTTGC
<i>FAT10</i>	Sens	CAGAGATGGCTCCCAATGCT
	Antisens	TTGGGAAATCATCAGAAGAT
<i>PPARα</i>	Sens	GGTGGACACGGAAAGCCCAC
	Antisens	GGACCACAGGATAAGTCACC
<i>HMGCS2</i>	Sens	AGGCTGGAAGTAGGCACTGA
	Antisens	GTGGGACGAGCATTACCACT
<i>PDK4</i>	Sens	GATGAACCAGCACATTCTTA
	Antisens	GCTACCACATCACAGTTAGG
Souris		
<i>Cyclophiline</i>	Sens	GCATACGGGTCCTGGCATCTTGTC

	Antisens	ATGGTGATCTTCTTGCTGGTCTTGC
<i>Fat10</i>	Sens	TTCTGTCCGCACCTGTGTTG
	Antisens	TGCCCTCGTTTTTGGACTC
<i>Ppara</i>	Sens	ATCGCGTACGGCAATGGCTTTA
	Antisens	CAGGCCGATCTCCACAGCAAATTA
<i>Hmgcs2</i>	Sens	TGCCATGTATCTGTTTTGG
	Antisens	TGCAAGTGAAGAGAGCGATG
<i>Cpt1α</i>	Sens	TGGTTAACAGCAACTACTACG
	Antisens	GACGAATAGGTTTGAGTTCC
<i>Acadvl</i>	Sens	CTCAGTGAAGAACAGGCACAA
	Antisens	CTT GGC AGG GTC ATT CAC TT
<i>Acadl</i>	Sens	ATC TTT TCC TCG GAG CAT GA
	Antisens	TTT CTC TGC GAT GTT GAT GC
<i>Acadm</i>	Sens	GCC CAG AGA GCT CTA GAC GA
	Antisens	CCA GGC TGC TCT CTG GTA AC
<i>Aco</i>	Sens	ACG TCT TGG ATG GTA GTC CG
	Antisens	TAA CGC TGG CTT CGA GTG AG
<i>Cyp4a10</i>	Sens	TGA GGG AGA GCT GGA AAA GA
	Antisens	CTG TTG GTG ATC AGG GTG TG
<i>Cyp4a14</i>	Sens	TTGCTCAGGACACACAGAT
	Antisens	TCCTCCATTCTGGCAAACAAGA
<i>Scd1</i>	Sens	TTCCCTCCTGCAAGCTCTACACCTG
	Antisens	AGCCGTGCCTTGTAAGTTCTGTGG
Gène	Source	Référence
Référence sondes TaqMan Gene Expression Assay (FAM)		
<i>FAT10</i> humain	Fisher Scientific	Hs00197374_m1
<i>Actine</i> humaine	Fisher Scientific	Human ACTB (20X) 4326315E
<i>Fat10</i> murin	Fisher Scientific	Mm01972246_s1
<i>Actine</i> murine	Fisher Scientific	Mouse ACTB (20X) 4352351E

Tableau 7 : Séquences et références des amorces utilisées lors de la thèse.

g. Extraction et quantification des protéines par western blot et co-immunoprécipitation

i. Western Blot

Les protéines ont été extraites à partir des cellules et des tissus à l'aide d'un tampon de lyse RIPA composé de TRIS-HCl 50mM, pH=8, 150mM NaCl, 5g/L de sodium déoxycholate, 1% NP40, 2mM EDTA (Éthylène Diamine Tétraacétique) et 2,1 g/L NaF auquel sont ajouté extemporanément des inhibiteurs de protéase (PMSF (Fluorure de Phénylméthyl Sulfonyl) et un cocktail d'anti-protéases). Les lysats

cellulaires ont ensuite été homogénéisés à l'aide d'un bras de sonication pendant 1 minute puis stockés à -20°C.

La concentration en protéine des échantillons a été mesurée à l'aide d'un kit de dosage colorimétrique BCA (Thermo Scientific).

Les protéines, préalablement dosées, ont ensuite été diluées à la concentration de 40µg/mL dans un tampon de Laemmli 5X composé de 50% de glycérol, 4% de β-mercaptoéthanol, 115g/L de SDS (Sodium Dodécyl Sulfate), du bleu de Bromophénol, QSP d'eau distillée. La dénaturation des protéines a ensuite été effectuée par l'exposition des échantillons à une température de 95°C pendant 5 minutes puis les échantillons ont été déposés sur des gels à 12% d'acrylamide plongés dans un tampon de migration (Euromedex – TG-SDS 10X). Les protéines ont été soumises à un courant de 80 volts pendant 30 minutes puis 120 volts pendant 1 heure pour qu'elles se séparent en fonction de leurs poids moléculaires le long du gel. Une fois la migration à travers le gel terminée, les protéines ont été transférées sur une membrane de nitrocellulose à l'aide d'un appareil de transfert imposant un courant de 150mA.

Les membranes ont ensuite été plongées dans une solution de TBS contenant 0,1% de Tween 20 et 5% (TBS-T) de lait écrémé en poudre pendant 1 heure puis incubées avec les différentes solutions d'anticorps (dilutions et références contenues dans le **Tableau 8**) pendant une nuit à 4°C sous agitation.

Le lendemain, après 3 lavages de 5 minutes avec du TBS-T pendant 1 heure sous agitation à température ambiante les membranes ont été incubées avec les anticorps couplés avec une HRP secondaires dirigés contre les espèces correspondant aux anticorps primaires. Les membranes sont à nouveau lavées 3 fois 5 minutes avec le TBS-T puis incubées pendant 1 minute avec le kit Dura contenant un substrat chimiluminescent de l'HRP (Horseradish Peroxidase). La luminescence est enfin révélée et acquise par l'appareil iBright 1500 (Invitrogen).

ii. Co-immunoprécipitation (Co-IP)

Les protéines ont été extraites à partir des cellules à l'aide d'un tampon de lyse présent dans le kit Pierce Crosslink IP/Co-IP (ThermoFischer Scientific) puis soniquées avec un bras de sonication pendant 1 minute.

La concentration en protéines des échantillons a ensuite été mesurée immédiatement à l'aide d'un kit de dosage BCA (Thermo Scientific).

La Co-IP a ensuite été réalisée sur 1000 µg de protéines à l'aide de billes magnétiques sur lesquelles des anticorps spécifiques de FAT10 (voir **Tableau 8**) ont été fixés. Ces billes ont été préparées en suivant les instructions du fournisseur du kit Pierce Crosslink IP/Co-IP et ont été mises en présence des protéines sous agitation pendant une nuit à 4°C.

Le lendemain, les protéines immunoprécipitées ont été récupérées en suivant les instructions du fournisseur puis ont été immédiatement préparées pour une analyse par western blot comme détaillé précédemment.

h. Immunomarquages

i. Immunofluorescence (IF)

Les cellules ont étéensemencées à une densité de 50 000 cellules sur des lamelles de verres préalablement recouvertes d'une couche de poly-L-lysine (Sigma-aldrich) dans des plaques 12 puits. Les traitements et transfections nécessaires à la modulation des expressions de *FAT10* et de *PPAR α* ont été réalisés comme décrit précédemment. Après 3 lavages de 5 minutes avec du PBS 1X, les cellules ont été fixées par une solution de PAF à 4%. La PAF a ensuite été éliminée par 3 lavages de 5 minutes avec du PBS 1X puis les cellules ont été perméabilisées et bloquées avec une solution de PBS 1X contenant 0,2% de triton X100 et 1% de BSA pendant 30 minutes à température ambiante sous agitation. Les lamelles ont ensuite été incubées avec une solution contenant les anticorps primaires (voir **Tableau 8**) pendant la nuit, à 4°C. Des lamelles sont incubées de la même façon sans anticorps primaires afin de contrôler la spécificité des anticorps secondaires (contrôles ig). Le lendemain, les lamelles ont été lavées 3 fois 5 minutes avec une solution de PBS 1X contenant 0,2% de triton X100 (PBS-triton) sous agitation. Ensuite, elles ont été incubées avec une solution contenant du NucBlue et les anticorps secondaires, dont les dilutions sont récapitulées dans le **Tableau 8**, pendant 1 heure à température ambiante. Enfin, les lamelles ont été lavées 2 fois 10 minutes avec du PBS-triton puis 1 fois 10 minutes avec de l'eau distillée avant d'être montées sur lames avec un milieu de montage hydrophile.

Une fois les lames sèches, la fluorescence a été mesurée au microscope confocal Spinning Disk (Zeiss) ou LSM700 avec l'objectif 40X (milieu d'immersion : huile) et les fluorescences rouge, verte et du NucBlue ont été acquises à l'aide de laser à des longueurs d'ondes respectives 594nm, 488nm et dans l'UV.

ii. Tyramide

Les coupes de foies destinées aux marquages IF ont été déparaffinées à l'aide de l'automate de coloration. Pour cela, les lames ont été d'abord plongées dans deux bains successifs de Clearène pendant 5 minutes, puis dans un bain d'éthanol 100% pendant 2 minutes, dans un bain d'éthanol 96% pendant 2 minutes, et dans un bain d'éthanol 70% pendant 2 minutes. Ensuite, les coupes ont été

lavées dans un bain d'eau distillée pendant 2 minutes, puis un nouveau bain d'eau distillée pendant 15 minutes. Le démasquage des antigènes a ensuite été réalisé à l'aide d'une chambre de démasquage (decloaking chamber) dans laquelle les échantillons ont été chauffés à 95°C pendant 30 minutes dans un bain contenant une solution de démasquage (Diva Decloaker). Les coupes ont ensuite été délimitées avec un stylo hydrophobe et les peroxidases endogènes ont été neutralisées avec la solution prévue à cet effet dans le kit Tyramide pendant 1 heure à température ambiante. Le blocage des coupes a été réalisé à l'aide d'une solution de PBS-triton contenant 1% de BSA et 1% de sérum de chèvre pendant 1h à température ambiante. Par la suite, les coupes ont été incubées avec une solution de la même composition que la solution de blocage contenant les anticorps primaires (voir **Tableau 8**) pendant la nuit, à 4°C. Certaines coupes ont été incubées de la même façon sans anticorps primaires afin de contrôler la spécificité des anticorps secondaires (contrôles ig). Le lendemain, les coupes ont été lavées 3 fois 10 minutes avec une solution de PBS-triton. Puis le marquage avec la technologie Tyramide a été réalisé en suivant les instructions du fabricant et en incubant les coupes avec le mix d'amplification pendant 5 minutes. Les lamelles ont été lavées 3 fois 5 minutes avec du PBS-triton puis incubées avec une solution de PBS 1X contenant du NucBlue pendant 20 minutes à température ambiante. Enfin, les coupes ont été lavées 2 fois 5 minutes avec une solution de PBS 1X puis 1 fois 5 minutes avec de l'eau distillée avant d'être montées sur lames avec un milieu de montage hydrophile.

Une fois les lames sèches, la fluorescence a été acquise par un scanner de lame (Zeiss), la fluorescence rouge ou verte associée au signal PLA et du NucBlue ont été acquises à l'aide de lasers à longueurs d'ondes 594nm ou 488nm et dans l'UV.

iii. Proximity Ligation Assay (PLA)

Les cellules sur lamelles et les tissus sur lames ont été fixées, perméabilisées et bloquées de la même façon que pour les marquages immunofluorescents et Tyramide présentés précédemment. Les échantillons ont été incubés avec les anticorps primaires avec les dilutions détaillées dans le **Tableau 8** ci-dessous à 4°C pendant la nuit. Le marquage des interactions par la technique de PLA a ensuite été réalisé comme indiqué par le fournisseur puis les lames ont été montées avec le milieu de montage hydrophile.

Une fois les lames sèches, la fluorescence a été mesurée au microscope confocal Spinning Disk (Zeiss) avec l'objectif 40X (milieu d'immersion : huile) et la fluorescence rouge associée au signal PLA et du NucBlue ont été acquises à l'aide de laser à longueurs d'ondes 594nm et dans l'UV. Les images représentées sont la projection sur l'axe z d'un ensemble de photos prises sur l'épaisseur de l'échantillon (z-stack).

Le nombre d'interaction par cellule a pu être quantifié grâce à une macro réalisée en collaboration avec la plateforme d'imagerie cellulaire (Plateformes Lilloises en Biologie et Santé (PLBS) - UAR 2014 - US 41, Antonino Bongiovanni). La macro est codée en langage Javascript sur le logiciel Fiji. Pour chaque image analysée, la macro réalise la projection de la pile d'image sur l'axe z. Sur cette image, la macro détecte les noyaux des cellules puis découpe l'espace en polygones correspondant à la surface des cellules avec un diagramme de Voronoï. Ensuite, dans chaque polygone la macro détecte les spots de couleur rouge. Les résultats obtenus donnent le nombre de spot par cellules pour chaque image.

Anticorps	Source	Référence	Application	Dilution	Tampon
Anticorps primaires					
β-actine	Sigma-Aldrich	15441	WB	1/2000	TBS-T/ lait 5%
HSP90	Santa Cruz	Sc-8303	WB	1/1000	TBS-T/ lait 5%
PPARα	Santa Cruz	Sc-398394	WB	1/1000	TBS-T/ lait 5%
			IF	1/50	PBS/0,1% triton/ 1% BSA
			Tyramide	1/50	PBS/0,1% triton/ 1% BSA/ 1% serum de chèvre
			PLA	1/50	Antibody diluent (kit PLA)
FAT10	Millipore	MABS351	WB	1/1000	TBS-T/ lait 2,5%/ BSA 2,5%
			Co-IP	1/10	IP lysis/wash buffer (kit Co-IP)
FAT10	LS Bio	LS-C166057	IF	1/50	PBS/0,1% triton/ 1% BSA
			Tyramide	1/50	PBS/0,1% triton/ 1% BSA/ 1% serum de chèvre
			PLA	1/50	Antibody diluent (kit PLA)
DDK	Origene	TA50011	WB	1/1000	TBS-T/ lait 5%
HDAC6	Cell signaling	76125	PLA	1/50	Antibody diluent (kit PLA)
LC3	Cell signaling	27755	WB	1/1000	TBS-T/ BSA 5%
Ubiquitine	Cell signaling	39335	WB	1/1000	TBS-T/ BSA 5%
p62	Proteintech	18420-1-AP	WB	1/1000	TBS-T/ lait 5%
Anticorps secondaires					
Anticorps	Source	Référence	Application	Dilution	Tampon
Alexa 488 rabbit	Invitrogen	A27034	IF	1/500	PBS/0,1% triton/ 1% BSA
Alexa 594 mouse	Invitrogen	A11030	IF	1/500	PBS/0,1% triton/ 1% BSA
HRP mouse	Sigma-aldrich	A4416	WB	1/5000	TBS-T/ lait 5%
HRP rabbit	Sigma-aldrich	A0545	WB	1/5000	TBS-T/ lait 5%

Tableau 8 : Références et dilutions des anticorps primaires et secondaires utilisés lors de la thèse.

i. Analyses statistiques

Les résultats obtenus *in vitro* sont représentés sous la forme de moyenne \pm SD (Standard Deviation) et les résultats *in vivo* sont représentés sous la forme moyenne \pm SEM (Standard Error of Mean) sauf indication contraire dans les légendes des figures concernées. Les différences statistiques entre deux groupes ont été évaluées par un test de Student. Lorsque trois groupes ou plus sont concernés, les différences statistiques ont été évaluées par une One-Way ou Two-Way ANOVA avec une correction de Bonferroni. Les statistiques ont été réalisées avec le logiciel GraphPad Prism et les symboles indiquant les p-value sont indiqués dans les légendes des figures.

3) Résultats

a. FAT10 est surexprimée dans le foie lors de la progression de la NASH et corrèle négativement avec *PPARα*

i. L'expression de FAT10 est augmentée dans les foies des patients atteints de NASH

Dans l'objectif d'identifier des gènes différentiellement exprimés au cours de la progression de la NASH, des données transcriptomiques issues de foies de patients obèses ($IMC \geq 30 \text{ kg/m}^2$) atteints ou non de NASH (NASH avec $NAS > 5$ $N=129$ vs no NASH avec $NAS < 3$ $n=76$) ont été étudiées. Comme attendu, parmi les 20 premiers gènes les plus fortement modulés dans un contexte de NASH, des gènes impliqués dans l'inflammation tels que *CXCL10* ou *CXCL9* ont été identifiés (*Dali-Youcef N et al, Hepatol Comm, 2019 ; Vandell J et al, Hepatol, 2020*) (**Fig. 22 (A)**). Il est intéressant d'observer que le gène *FAT10* fait partie de cette liste et que le Volcano Plot effectué à partir de ces données montre que *FAT10* est surexprimé dans les foies des patients du groupe NASH (**Fig. 22 (B)**).

Dans le but de mieux caractériser l'expression de *FAT10*, un marquage immunofluorescent de la protéine *FAT10* a été réalisé sur des coupes de foies de patients sains (stéatose $S < 33\%$; inflammation $I=0$, ballonnisation $B=0$ et fibrose $F=0$, $N=5$) et de patients atteints de NASH ($S > 5\%$, $I > 1$, $B=2$ et $F < 3$, $N=5$). Le marquage vert pour *FAT10* apparaît plus intense dans les foies des patients atteints de NASH que dans ceux des patients sains. De plus, il est constaté que la protéine est exprimée de façon diffuse dans le cytoplasme et le noyau des hépatocytes des foies de patients atteints de NASH (**Fig. 22 (C)**).

Ces observations montrent que l'expression génique et protéique de *FAT10* est augmentée dans les foies de patients atteints de NASH.

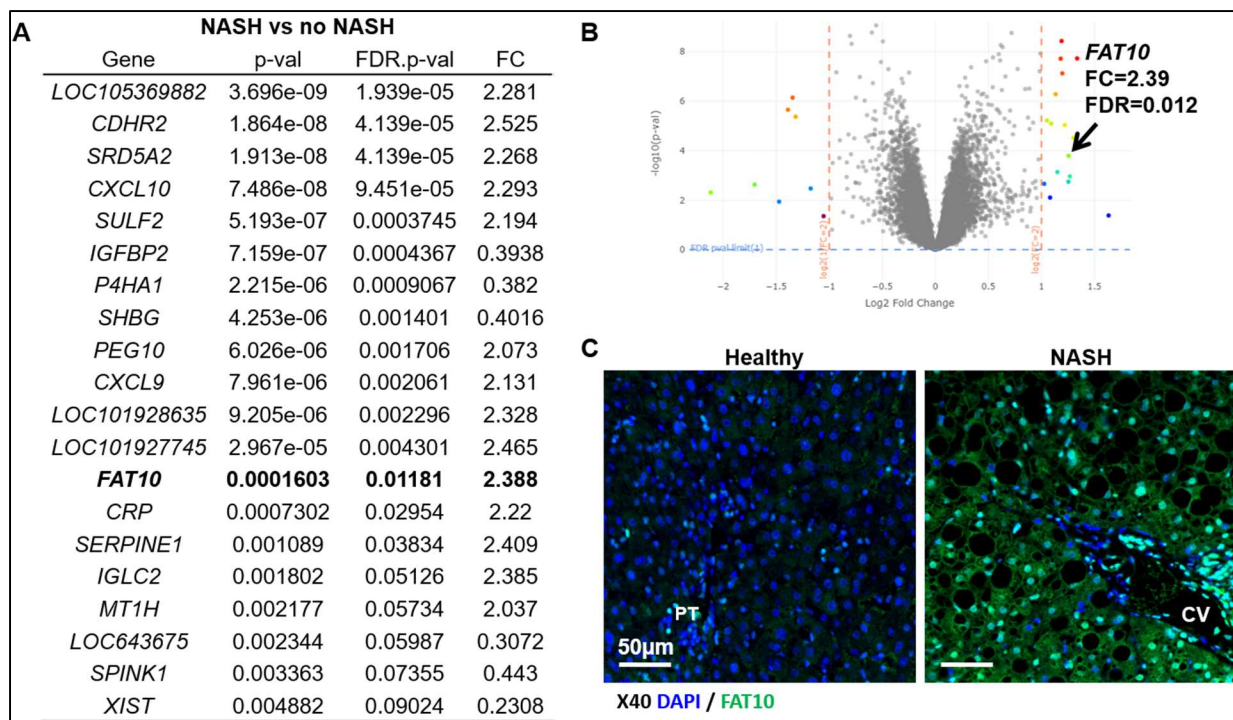


Figure 22 : L'expression de *FAT10* est augmentée dans les foies des patients atteints de NASH.

L'analyse transcriptomique des foies de 205 patients obèses répartis en deux groupes : NASH (N=129) vs no NASH (N=76) a permis l'obtention de **(A)** la liste des 20 premiers gènes différentiellement exprimés et **(B)** le Volcano Plot correspondant (p-val = p-value ; FDR = False Discovery Rate ; FC = fold change). **(C)** Images représentatives de l'immunomarquage *FAT10* sur des coupes de foie de patients « Healthy » (N=5 ; S<33% ; I, B et F=0) et de patients « NASH » (N=10 ; S>5% ; I>1 ; B=2 ; F<3). Les noyaux sont marqués en bleu (DAPI) et le marquage spécifique de *FAT10* est obtenu par un kit d'amplification Tyramide vert (Alexa 488). Les veines centrales et les triades portaies sont respectivement indiquées par « CV » et « PT » sur les images. La barre d'échelle représente 50µm.

ii. L'expression de *FAT10* corrèle positivement avec la sévérité de la maladie et avec l'inflammation

Afin de mieux comprendre l'évolution de l'expression de *FAT10* lors du développement de la NASH, les patients ont été répartis en trois groupes selon la sévérité de leur grade de NAFLD : « no NASH » (NASH Activity Score, NAS=0) et « NASH » (NAS≥3 avec S>1, B> 1 et I>1) puis l'expression de *FAT10* a été mesurée pour chaque groupe et corrélée aux différents paramètres histologiques de la maladie : stéatose (S), ballonisation (B) et inflammation (I). L'expression de *FAT10* est significativement augmentée dans les foies des patients atteints NASH (**Fig. 23 (A)**) et corrèle positivement avec le NAS (**Fig. 23 (B)**). En outre, l'expression de *FAT10* augmente progressivement avec la sévérité de la maladie et avec les différents scores histologiques : stéatose, ballonisation et inflammation (**Fig. 23 (C)**). De plus, l'expression de *FAT10* corrèle positivement à celle de gènes pro-inflammatoires connus pour être associés à la sévérité de la maladie (**Fig. 23 (D)**) ; Dali-Youcef N et al, *Hepato Comm*, 2019). Ainsi, la

surexpression de *FAT10* semble être associée au développement de l'inflammation observée lors du développement de la NASH.

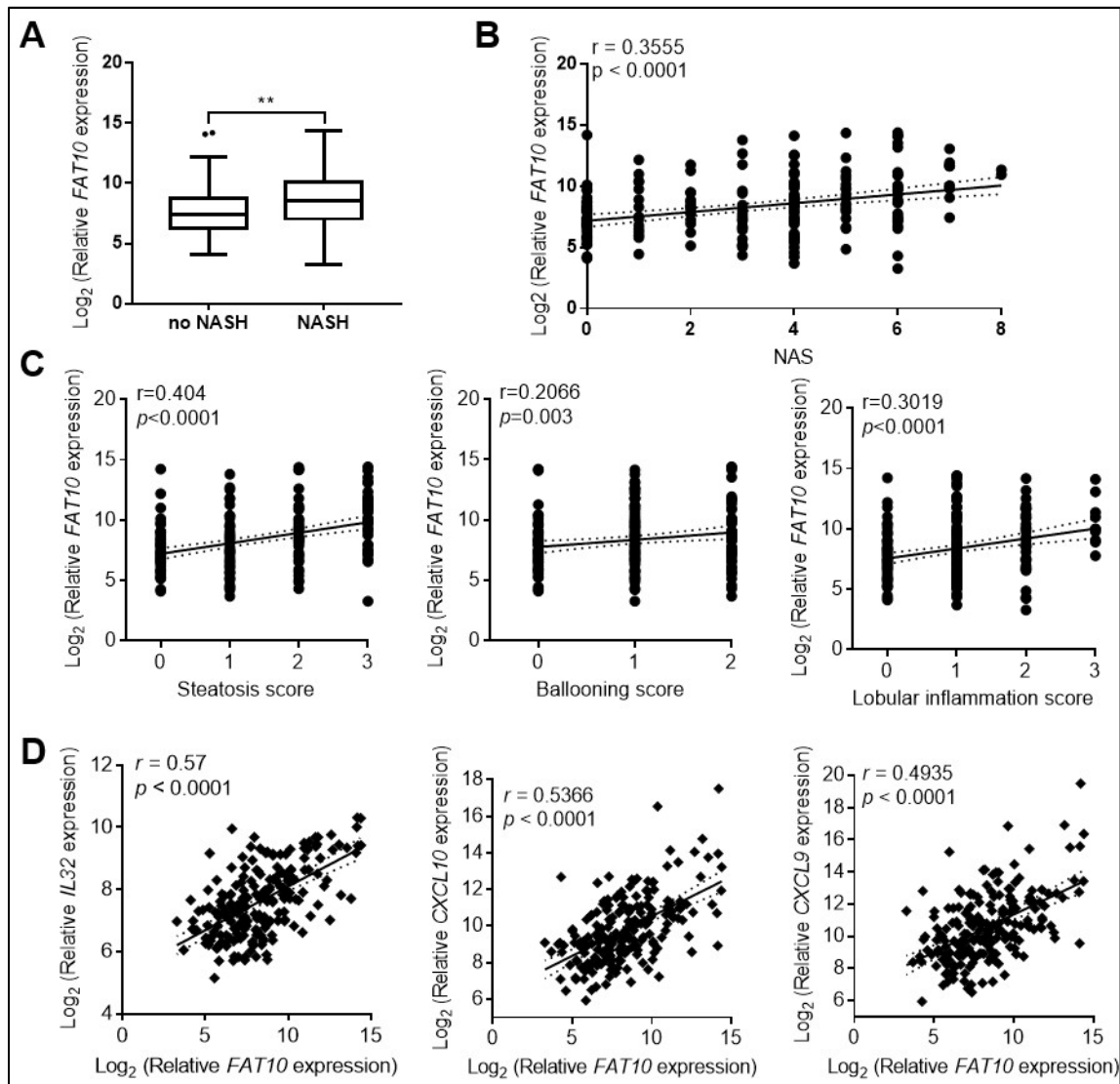


Figure 23 : L'expression de *FAT10* corrèle positivement avec la sévérité de la maladie et l'inflammation.

(A) Mesure de l'expression de *FAT10* dans les foies des patients NASH (N=129) et no NASH (N=76). Médiane \pm écart interquartile, représentées sous forme de boîte à moustache de Tukey. T-test de Student, ** $p < 0,01$. Corrélation entre l'expression de *FAT10* et (B) le NAS, (C) les scores histologiques et (D) les expressions d'*IL32*, *CXCL10* et *CXCL9* dans les foies des 205 patients obèses. Les corrélations sont des régressions linéaires dont les droites sont représentées avec un intervalle de confiance à 95% (lignes pointillées). Le coefficient de corrélation, r , et la p -value, p sont indiqués.

Pour aller plus loin, l'expression de *FAT10* a été mesurée dans les foies des patients atteints de NASH avant et après 1 an de perte de poids suite à une chirurgie bariatrique ou l'application de RHD. En effet, il a été démontré que la perte de poids favorise la régression de la NASH et restaure l'expression de *PPAR α* (Francque *et al.*, 2015; Lassailly *et al.*, 2015). Or, l'expression de *FAT10* est diminuée dans le foie des patients après 1 an de traitement (Fig. 24 (A)). De plus, la mesure de l'expression de *FAT10* spécifiquement dans les foies des patients dont les paramètres histologiques

ont progressé (ΔS , ΔB ou $\Delta I > 1$), se sont stabilisés (ΔS , ΔB ou $\Delta I = 0$) ou ont régressé (ΔS , ΔB ou $\Delta I < -1$) révèle que l'expression de *FAT10* diminue de manière significative uniquement chez les patients pour lesquels les paramètres de stéatose et d'inflammation ont régressé (**Fig. 24 (B)**). Ces résultats suggèrent que l'augmentation de l'expression de *FAT10*, observée lors du développement de la NASH, est potentiellement réversible lors d'une perte de poids induisant une résolution de la maladie.

De tels constats montrent donc que la surexpression hépatique de *FAT10* est positivement corrélée à la sévérité de la maladie et en particulier à l'inflammation. Ces résultats amènent aussi à comprendre que cette surexpression est réversible lorsque l'histologie du patient atteint de NASH s'améliore suite à une perte de poids.

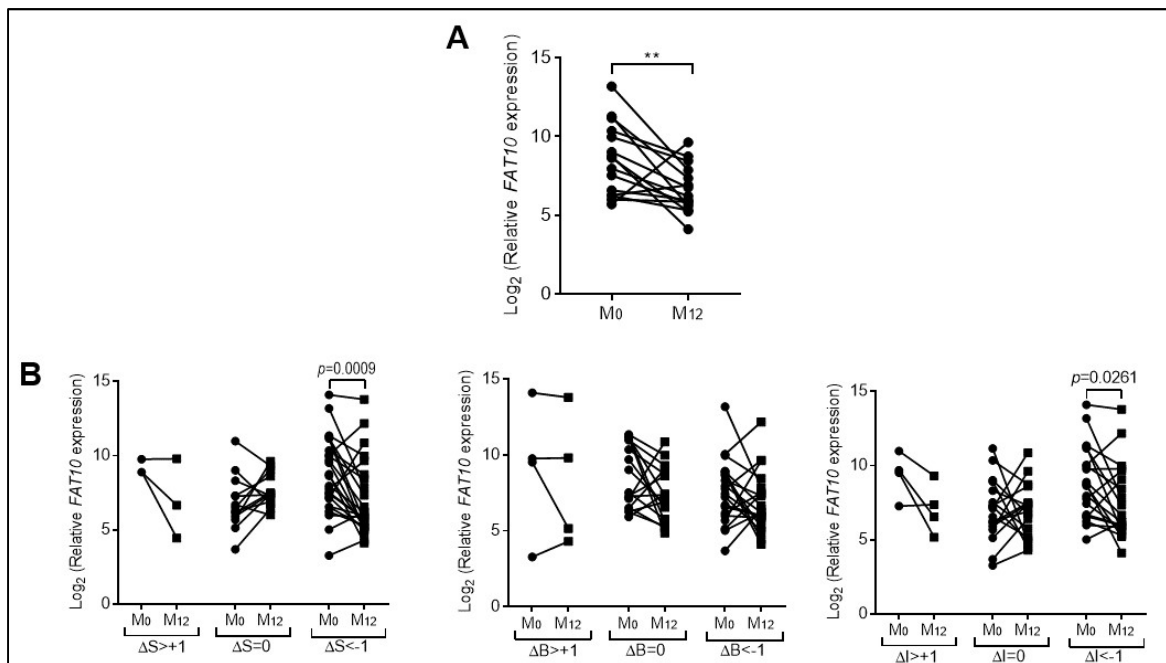


Figure 24 : L'expression de *FAT10* diminue lors de la résolution de la NASH suite à une perte de poids.

(A) Mesure de l'expression de *FAT10* dans les foies des patients avant (M0) et 1 an après chirurgie bariatrique (M12 ; N=28). T-test de Student, ** $p < 0,01$. (B) Mesure de l'expression de *FAT10* dans les foies des patients avant (M0) et 1 an après l'application d'un traitement pour perdre du poids (M12 ; chirurgie bariatrique N=28 et RHD N=32) pour des patients pour lesquels une régression ($\Delta < -1$), une stabilisation ($\Delta = 0$) ou une progression ($\Delta > +1$) des paramètres histologiques est observée. T-test de Student, ** $p < 0,01$.

iii. L'expression de *FAT10* corrèle négativement avec l'expression de *PPAR α* et celle de ses gènes cibles

Dans le but de voir si l'augmentation de l'expression de *FAT10*, observée précédemment, est associée à la modulation de l'expression de *PPAR α* , l'expression de *FAT10* a été corrélée à celle de *PPAR α* dans les foies des patients étudiés. Ainsi, l'expression de *FAT10* est négativement corrélée à

celle de *PPARα*. De même, l'expression de *FAT10* corrèle négativement à l'expression de gènes cibles de *PPARα*, comme *HMGCS2*, impliqué dans la cétogenèse, ou *ACAA1*, impliqué dans la β -oxydation des acides gras (**Fig. 25**).

Ces résultats mettent donc en évidence une corrélation négative entre l'expression de *FAT10* et celle de *PPARα*. De plus, la surexpression de *FAT10* est associée à une inhibition de l'expression des gènes cibles de *PPARα* ce qui démontre une répression de l'activité transcriptionnelle de *PPARα* dans les foies humains lors de la progression de la NASH.

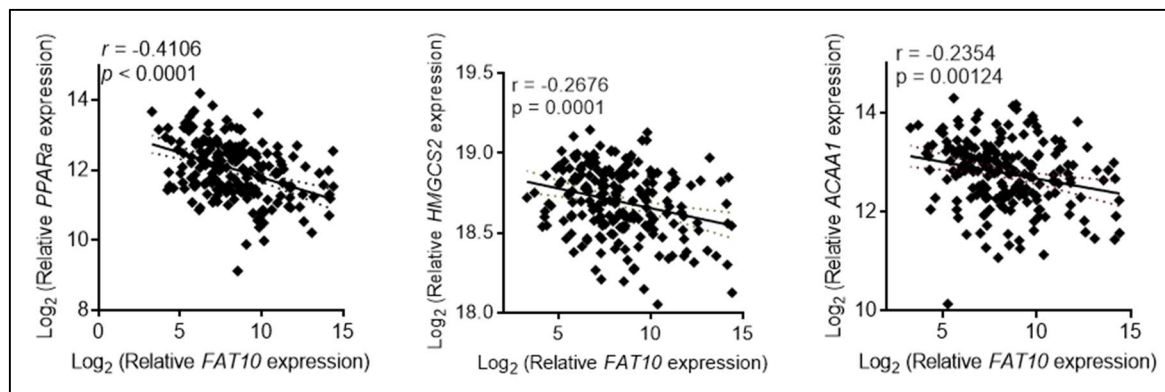


Figure 25 : L'expression de *FAT10* corrèle négativement avec l'expression de *PPARα* et de certains de ses gènes cibles.

Corrélation entre l'expression de *FAT10* et les expressions de *PPARα*, *HMGCS2* et *ACAA1* dans les foies des 205 patients obèses. Les corrélations sont des régressions linéaires dont les droites sont représentées avec un intervalle de confiance à 95% (lignes pointillées). Le coefficient de corrélation, r , et la p -value, p sont indiqués.

b. *Fat10* est surexprimée dans les hépatocytes de souris développant une NASH et corrèle négativement avec l'expression de *Ppara*

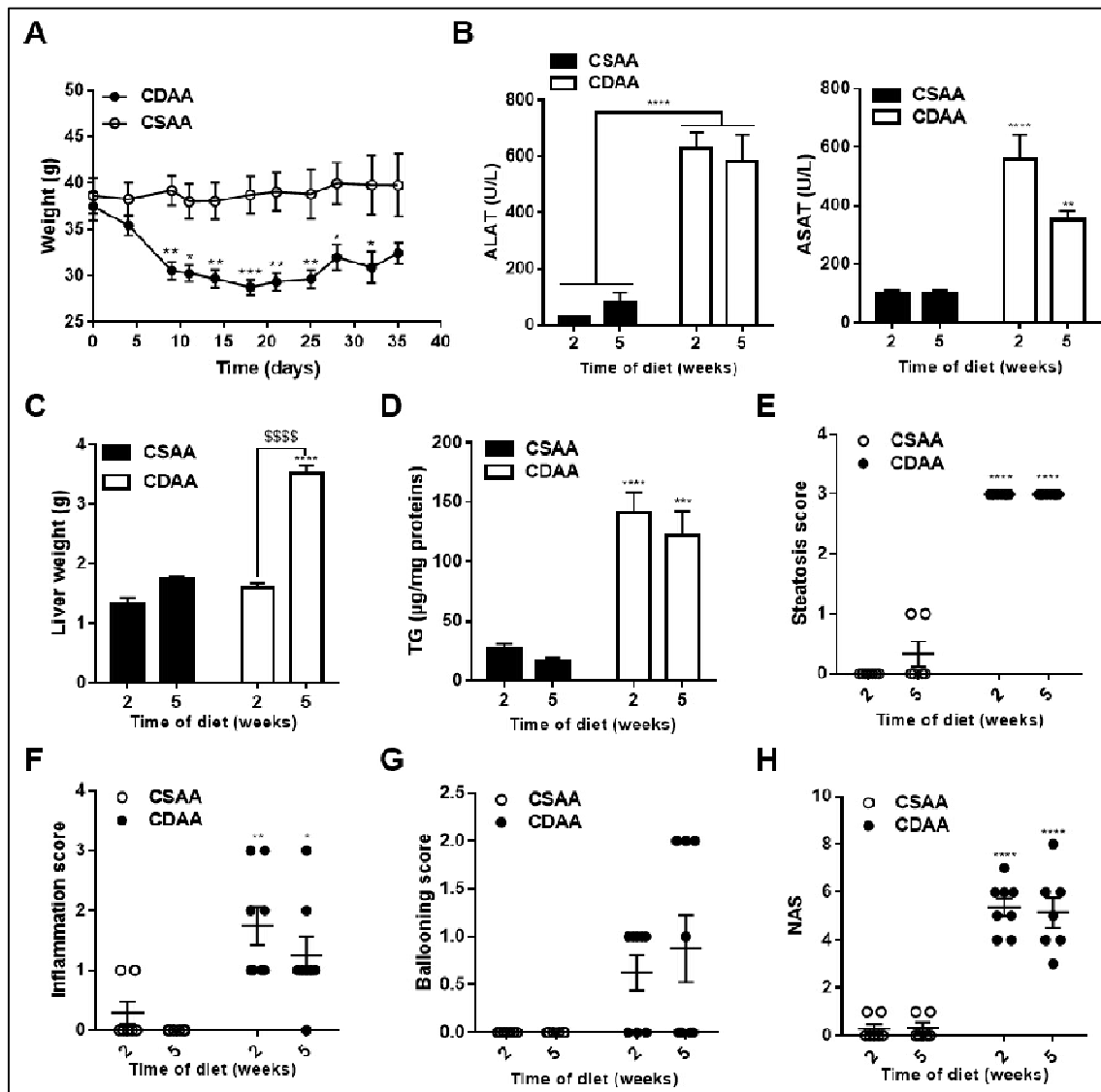
i. Établissement d'un modèle pré-clinique de NASH

Dans le but de mieux caractériser les expressions de *FAT10* et de *PPARα* lors de la progression de la NASH, un modèle pré-clinique de NASH induite par un régime a été établi. Pour ce faire, des souris C57Bl6/ J mâles ont été nourries avec un régime déficient en choline, enrichi en graisse et en cholestérol, supplémenté en glucose et en fructose (CDAA) ou un régime contrôle (CSAA) pendant 2 semaines. Du fait de sa composition, ce régime n'induit pas d'obésité mais provoque plutôt une perte de poids d'environ 10% du poids total qui se stabilise au bout d'une semaine (**Fig. 26 (A)**). Malgré cette perte de poids, la masse des foies des souris tend à augmenter après 2 semaines d'exposition au CDAA (**Fig. 25 (C)**). Cette légère augmentation du poids du foie est associée à une augmentation des transaminases, ALAT et ASAT, dans le sang qui témoignent d'une cytolysé hépatique caractéristique de la souffrance hépatocellulaire observée en réponse au régime (**Fig. 26 (B)**). La caractérisation

histologique du foie de ces souris a ensuite été réalisée par des marquages H&E puis par le calcul des scores de stéatose, de ballonisation et d'inflammation (**Fig. 26 (I)**). Nourrir les souris avec le régime CDAA pendant 2 semaines suffit à induire une macrostéatose sur plus de 66% de la surface des foies des souris (score maximum de stéatose de 3, **Fig. 26 (E)**). En effet, la déficience en choline bloque la sécrétion des VLDL depuis le foie induisant l'accumulation des lipides sous forme de gouttelettes dans le tissu hépatique (Jha *et al.*, 2014). De plus, le fructose et le glucose, ajoutés au régime, favorisent la lipogénèse *de novo* ce qui contribue à cette stéatose (Lim *et al.*, 2010). L'accumulation de TG dans le foie des souris nourries avec le régime CDAA pendant 2 semaines a été confirmée par une mesure de la concentration hépatique en TG qui est augmentée significativement dès 2 semaines de régime (**Fig. 26 (D)**). L'observation des coupes marquées à l'H&E a aussi permis d'établir les scores de ballonisation et d'inflammation. 2 semaines de régime CDAA induisent un accroissement du score d'inflammation ce qui traduit une formation de foyers inflammatoires dans les foies de souris à ce temps de régime (**Fig. 26 (F)**). Ce développement rapide de l'inflammation est attendu puisque le cholestérol, ajouté au régime, y contribue (Sumiyoshi M *et al*, *Br J Nutr.* 2010). En adéquation avec cette observation, l'expression de gènes pro-inflammatoires tels que *Tnfa* est augmentée par le régime CDAA à 2 semaines de régime. Cependant, l'expression d'*Il-6* n'est pas encore induite à ce temps de régime (**Fig. 26 (J)**). Le score de ballonisation, quant à lui, n'est augmenté que d'un point pour 5 souris sur les 8 nourries avec le régime CDAA pendant 2 semaines indiquant que les dommages hépatocellulaires induits par le régime sont modérés après 2 semaines d'exposition (**Fig. 26 (G)**). La somme des scores histologiques cités précédemment a permis de calculer le NAS qui atteint environ 6 pour les souris après deux semaines de régime ce qui permet de poser le diagnostic de NASH à ce temps de régime (**Fig. 26 (H)**). Enfin, dans le but de caractériser l'expression de *Ppara* dans ce modèle murin de NASH, une RT qPCR a été réalisée sur les foies des souris nourries avec le CDAA ou le CSAA pendant 2 semaines. Ainsi, l'expression de *Ppara* n'est pas diminuée significativement par les 2 semaines d'exposition au régime (**Fig. 26 (K)**).

Les mêmes mesures ont été reproduites sur les foies de souris nourries pendant 5 semaines avec le régime CDAA. De façon intéressante, après 5 semaines de régime, le poids du foie est significativement augmenté pour les souris CDAA par rapport aux souris CSAA (**Fig. 26 (C)**). Cette observation est due à une accumulation de TG dans les foies comme le traduit l'augmentation significative de la concentration en TG hépatique (**Fig. 26 (D)**). Le poids du foie des souris après 5 semaines de régime est supérieur à celui des souris après 2 semaines de régime ce qui démontre une augmentation du contenu lipidique avec le temps d'exposition au régime CDAA. L'observation des coupes H&E des souris après 5 semaines de CDAA (**Fig. 26 (I)**) a également permis d'établir le score de stéatose qui, déjà maximum après 2 semaines de régime, est maintenu élevé après 5 semaines de régime (**Fig. 26 (E)**). Le score de ballonisation est supérieur à 1 pour la majorité des souris nourries

avec le CDAA pendant 5 semaines ce qui indique une sévérité plus importante des dommages hépatocellulaires à ce temps long de régime (**Fig. 26 (G)**). Le score d'inflammation, quant à lui, est comparable au score évalué pour les souris à 2 semaines de régime (**Fig. 26 (F)**) et l'expression de *Tnfa*, déjà augmentée après 2 semaines de CDAA, est maintenue élevée après 5 semaines de régime. Cependant, l'expression d'*Il6* n'est augmentée qu'après 5 semaines de régime et semble donc être un marqueur plus tardif de l'inflammation (**Fig. 26 (J)**). Enfin, contrairement à ce qui est observé après 2 semaines de régime, l'expression de *Ppara* diminue fortement dans le foie des souris nourries pendant 5 semaines (**Fig. 26 (K)**). De ce fait, l'expression de *Ppara* n'est diminuée en réponse au CDAA qu'après un temps d'exposition prolongé de 5 semaines. Ainsi, la sévérité de la NASH induite par le CDAA est augmentée avec le temps d'exposition au régime. Par la suite, le temps de 2 semaines de régime CDAA sera choisi pour notre étude car nous souhaitons étudier les mécanismes précurseurs de la dérégulation de l'expression de *Ppara*.



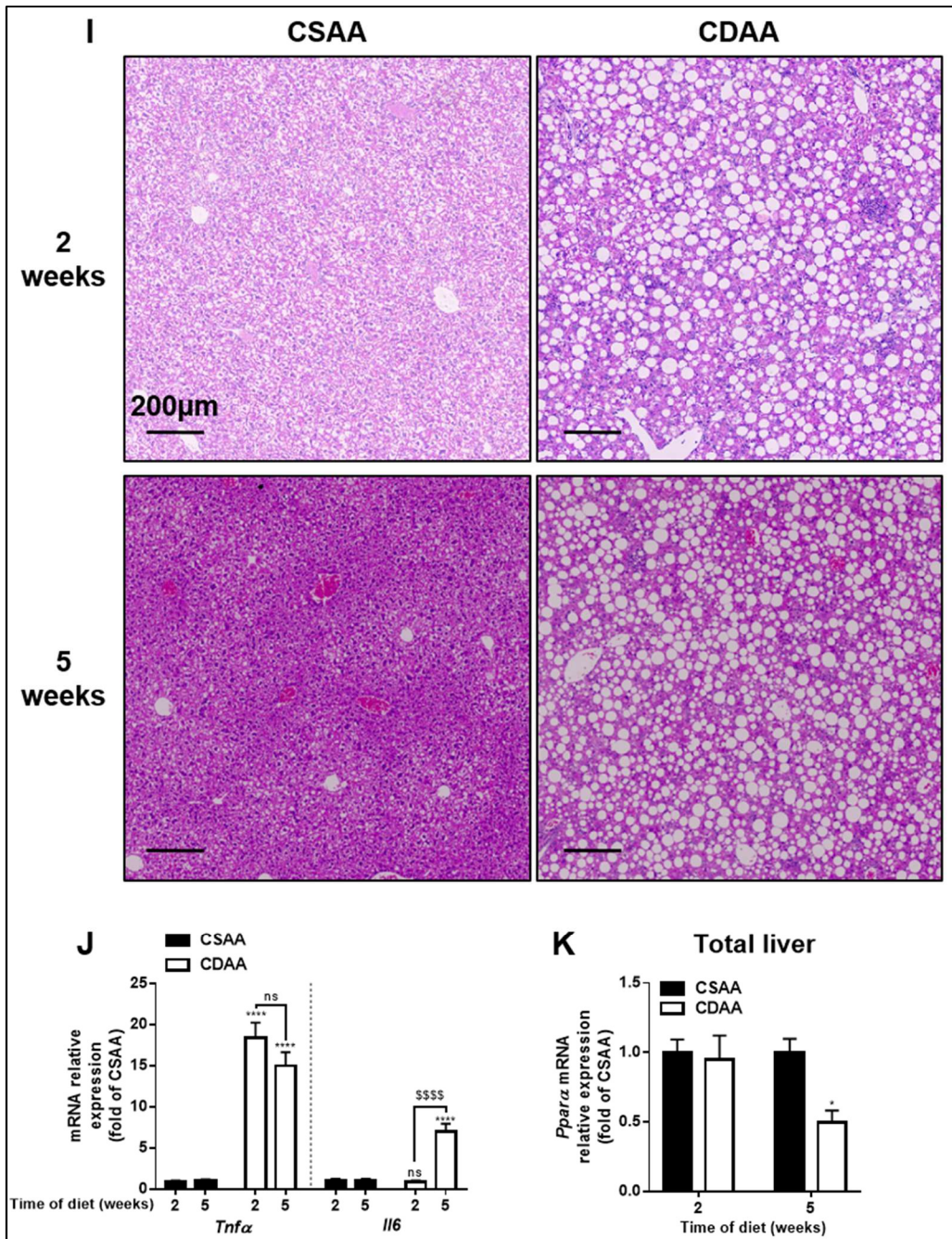


Figure 26 : Le régime CDAA induit le développement de la NASH dès 2 semaines d'exposition.

Des souris ont été nourries avec un régime CDAA ou CSAA pendant 2 (CDAA N=6 ; CSAA N=7) ou 5 semaines (CDAA N=7 ; CSAA N=6). **(A)** Mesure du poids des souris pendant 5 semaines de régime. **(B)** Mesure des concentrations plasmatiques en ALAT et ASAT. **(C)** Mesure du poids des foies des souris. **(D)** Mesure de la concentration hépatique en TG normalisée par la concentration en protéine des échantillons. Quantification des scores histologiques de **(E)** stéatose, **(F)** inflammation, **(G)** ballonisation et détermination du **(H)** NAS. (I) Images représentatives du marquage H&E sur des coupes de foie de souris CSAA 2 semaines et 5 semaines. La barre d'échelle représente 200µm. Mesures des expressions de (J) *Tnfα*, *Il6* et (K) *Ppara* dans les foies des souris nourries avec les CDAA ou le CSAA pendant 2 et 5 semaines. Les résultats sont exprimés par rapport à l'expression dans les foies des souris CSAA à laquelle a été attribuée la valeur 1. Moyennes ± SEM. Two-way ANOVA suivie d'un test de Bonferroni. CSAA vs CDAA : ns non-significatif ; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ et 2 semaines vs 5 semaines : ns non-significatif ; \$\$\$ $p < 0,0001$.

ii. *Fat10* est surexprimée dans les hépatocytes au cours du développement de la NASH

Dans l'objectif de caractériser l'expression hépatique de *Fat10* lors de la progression de la NASH, sa mesure a été effectuée dans les foies des souris nourries avec le CDAA pendant 2 ou 5 semaines par RT qPCR. De façon intéressante, l'expression de *Fat10* est augmentée de 2 fois dès 2 semaines de régime et d'environ 100 fois après 5 semaines de régime (**Fig. 27 (A)**). Ces résultats montrent que l'expression de *Fat10* augmente progressivement avec la sévérité de la NASH induite en réponse au CDAA ce qui confirme les observations faites dans le foie humain.

Comme expliqué précédemment, le régime CDAA induit les paramètres histologiques de NASH sans provoquer d'obésité ni d'insulino-résistance, deux des facteurs associés au développement de la maladie chez l'humain. Ainsi, pour confirmer nos observations précédentes, l'expression de *Fat10* a été mesurée dans les foies de deux autres modèles murins de NASH présentant une obésité et une insulino-résistance. D'abord, l'expression de *Fat10* a été mesurée dans le foie des souris nourries avec un régime riche en graisses, en cholestérol et en sucrose (HFHSHC). Ces souris développent rapidement une obésité, une insulino-résistance et présentent une NASH après 24 semaines d'exposition au régime (Haas *et al.*, 2019). Une augmentation progressive de l'expression de *Fat10* est observée avec la durée du régime et l'expression de *Fat10* est augmentée de 40 fois après 24 semaines de régime HFHCHS (**Fig. 27 (B)**). En parallèle, des données transcriptomiques de souris db/db nourries avec un régime MCD enrichi en graisse pendant 8 semaines, développant également une obésité, une insulino-résistance et une NASH, ont permis de confirmer la surexpression de *Fat10* dans le foie de ces souris (**Fig. 27 (C)**) (Kita *et al.*, 2012). Ces résultats confirment donc la surexpression de *Fat10* observée au cours du développement de la maladie dans des modèles murins de NASH présentant une obésité et une insulino-résistance (**Fig. 27 (C)**).

Par la suite, afin de s'affranchir de l'expression constitutive de *Fat10* dans les cellules immunes infiltrant le foie lors du développement de la NASH (Cai, Zhang and Li, 2019), et pour étudier l'expression de *Fat10* spécifiquement dans les hépatocytes, les cellules du foie des souris nourries avec le CDAA pendant 2 semaines ont été isolées. Ensuite, deux fractions cellulaires ont été séparées : les hépatocytes et les cellules non-parenchymateuses (contenant les cellules immunes). A partir de ces deux fractions, l'ARN a été extrait afin de réaliser des analyses de RT qPCR et des puces transcriptomiques. L'analyse transcriptomique montre que *Fat10* fait partie des gènes surexprimés dans les hépatocytes isolés des foies de souris nourries avec le CDAA par rapport aux hépatocytes de souris CSAA (**Fig. 27 (D)**). Ce résultat a également été observé par une analyse qPCR montrant que l'expression de *Fat10* est 4 fois plus élevée dans les hépatocytes (HP) des souris CDAA par rapport aux

souris CSAA. De façon intéressante, l'expression de *Fat10* dans la fraction non-parenchymateuse (NPC) n'est pas modulée par le régime CDAA (**Fig. 27 (E)**). Ces résultats montrent donc que l'augmentation de l'expression de *Fat10*, observée en réponse au régime CDAA, est spécifique des hépatocytes.

Dans le but de caractériser l'expression protéique de *Fat10* dans ce modèle, un immunomarquage a été réalisé sur des coupes histologiques de foies de souris nourries avec le CDAA ou le CSAA pendant 2 semaines. Comme observé chez l'humain, le marquage spécifique de *Fat10* (en vert) est plus intense chez les souris atteintes de NASH. Effectivement, dans les foies des souris nourries avec le CDAA, le marquage est diffus, majoritairement cytoplasmique et semble se concentrer dans les hépatocytes que l'on peut identifier le long des sinusoides et organisées en travées (**Fig. 27 (F)**).

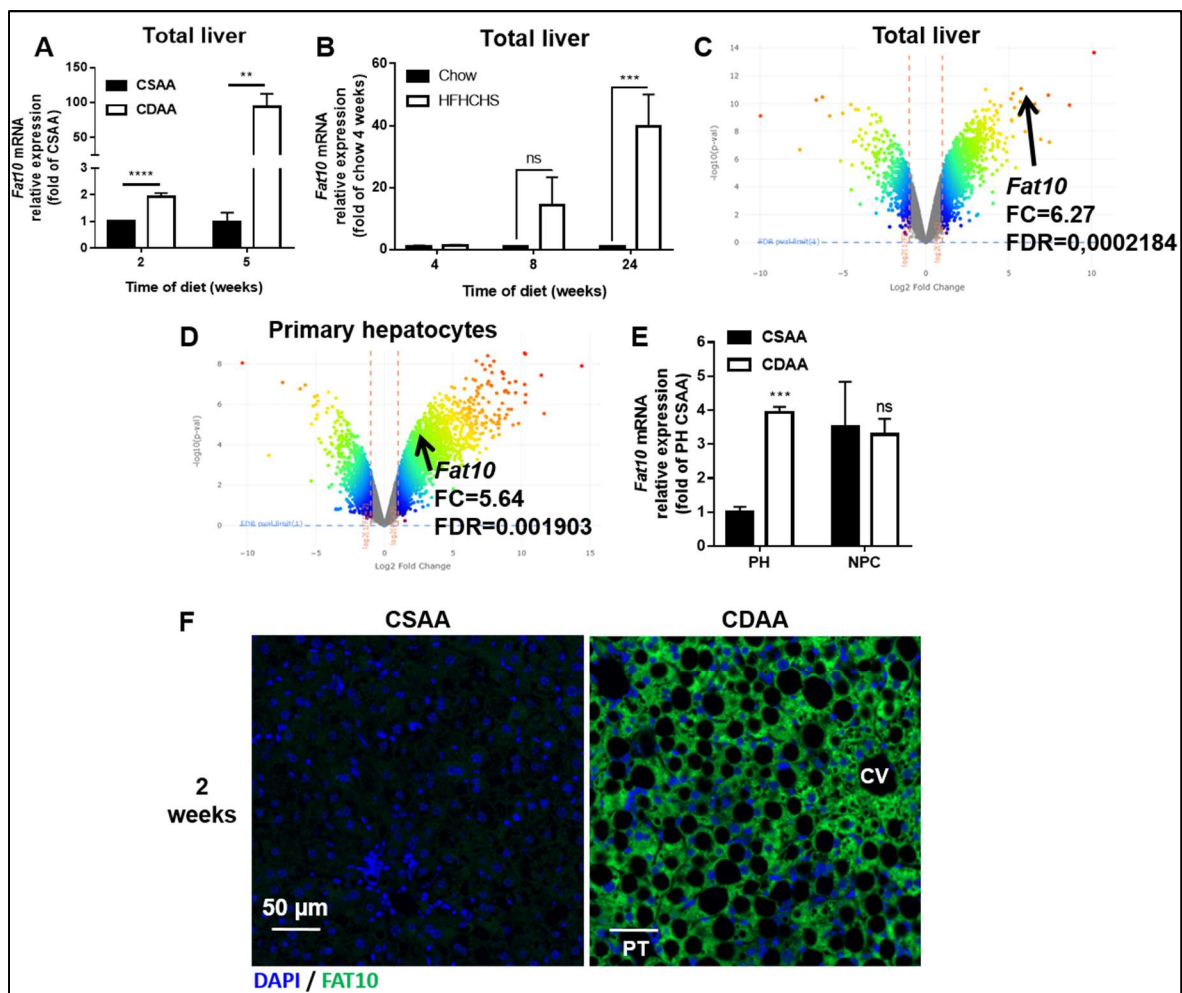


Figure 27 : *Fat10* est surexprimée dans les hépatocytes des souris atteintes de NASH.

Mesure de l'expression de *Fat10* dans (A) le foie total de souris nourries avec le CDAA et le CSAA pendant 2 et 5 semaines, ou (B) le foie de souris nourries avec un régime HFHCHS ou Chow pendant 4, 8 et 24 semaines. Les résultats exprimés par rapport à l'expression dans les foies des souris contrôles à laquelle a été attribuée la valeur 1. Moyennes \pm SEM. Two-way ANOVA suivie d'un test de Bonferroni. CSAA vs CDAA ou Chow vs HFHCHS : ns non-significatif ; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$. Volcano plots issus des données transcriptomiques obtenues à partir (C) des foies de souris db/db nourries avec un régime MCD pendant 8 semaines (données publiées Kita Y et al, Plos One, 2012) ou à partir (D) d'hépatocytes primaires isolés des foies de souris nourries avec un CSAA (N=3) ou un CDAA (N=3) pendant 2 semaines (p-val = p-value ; FDR = False Discovery Rate ; FC = fold change). (E) Mesure de l'expression de *Fat10* dans les hépatocytes primaires (HP) et dans les cellules non-parenchymateuses (NPC) isolées des foies des souris nourries avec le CDAA et le CSAA pendant 2 semaines. Les résultats exprimés par rapport à l'expression dans les HP des souris CSAA à laquelle a été attribuée la valeur 1. Moyennes \pm SEM. T-test de Student, ns non-significatif ; *** $p < 0,001$. (F) Images représentatives de l'immunomarquage *Fat10* sur des coupes de foie de souris nourries pendant 2 semaines avec le CSAA (N=5) et le CDAA (N=5). Les noyaux sont marqués en bleu (DAPI) et le marquage spécifique de *Fat10* est obtenu par un kit d'amplification Tyramide vert (Alexa 488). Les veines centrales et les triades portales sont respectivement indiquées par « CV » et « PT » sur les images. La barre d'échelle représente 50 μ m.

Afin de voir si, comme chez l'humain, la surexpression de *Fat10* lors de la progression de la NASH est associée au développement de l'inflammation, l'expression de *Fat10* a été corrélée à l'expression de gènes pro-inflammatoires dans les différents modèles murins présentés ci-dessus. Ainsi, l'expression de *Fat10* corrèle positivement à l'expression de *Tnf α* dans le foie des souris nourries avec le régime HFHCHS pendant 4 et 8 semaines (**Fig. 28 (A)**). De surcroît, l'expression de *Fat10* est positivement corrélée à celle de *Tnf α* dans le foie total des souris nourries avec le CDAA et le CSAA pendant 2 et 5 semaines (**Fig. 28 (B)**). Cependant, l'expression d'*Il6*, marqueur plus tardif d'inflammation, ne corrèle positivement avec l'expression de *Fat10* dans le foie des souris qu'après 5 semaines d'exposition au régime (**Fig. 28 (C)**). Ces observations se retrouvent dans les hépatocytes primaires isolés des foies des souris après 2 semaines de régime CSAA et CDAA (**Fig. 28 (D)**). Ces résultats démontrent donc que l'augmentation de l'expression de *Fat10* dans le foie des souris est associée au développement de l'inflammation lors de la progression de la maladie et ils confirment les observations concernant les foies humains.

Ces résultats démontrent donc que *Fat10* est surexprimé, à l'échelle génique et protéique, dans les hépatocytes de souris atteintes de NASH ce qui suggère un rôle de *Fat10* dans ces cellules lors du développement de la maladie.

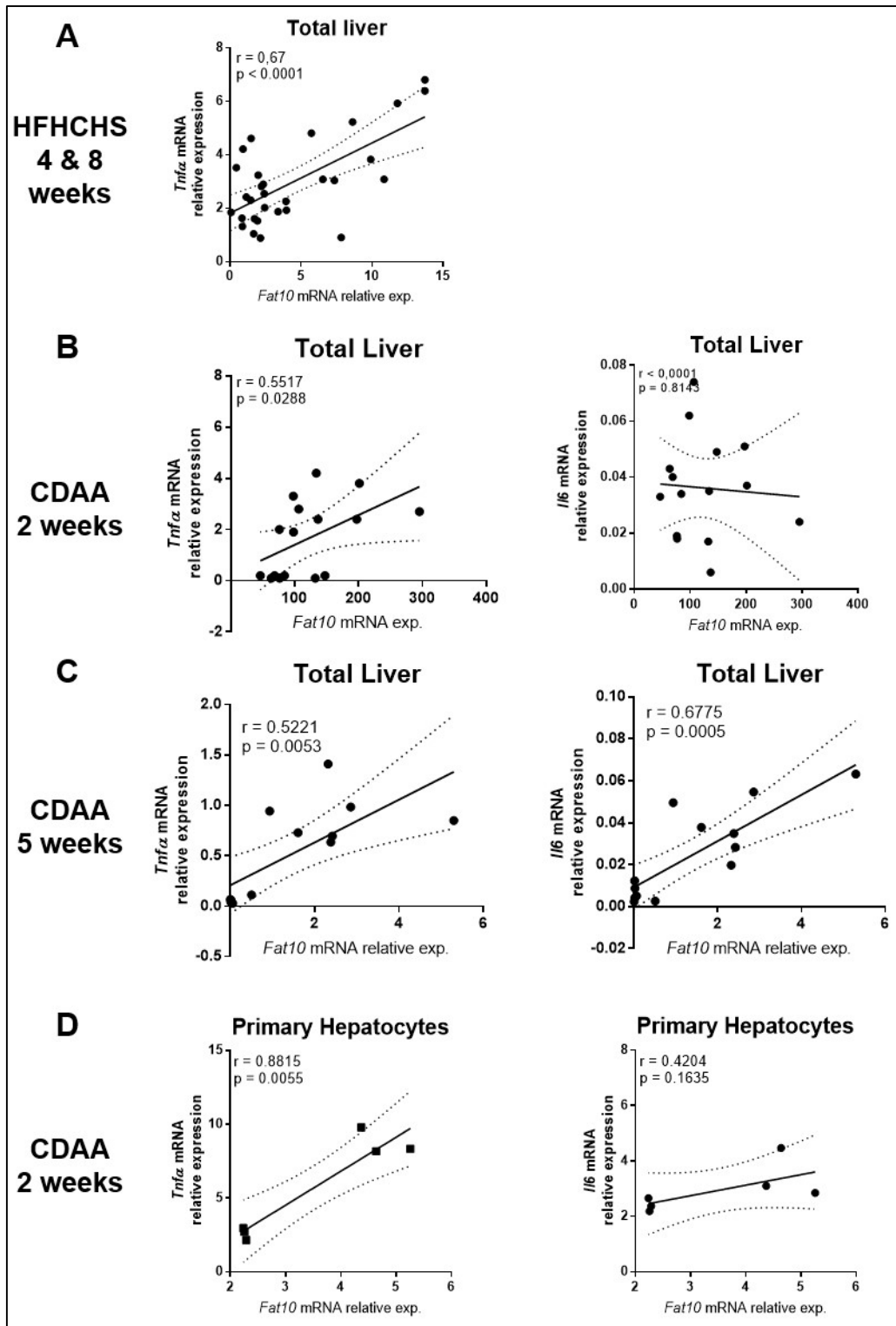


Figure 28 : L'expression de *Fat10* corrèle positivement avec l'expression de gènes pro-inflammatoires dans les foies de souris atteintes de NASH.

Corrélation entre l'expression de *Fat10* et les expressions de *Tnfa* et/ ou *Il6* dans (A) les foies des souris nourries avec un HFHCHS et un régime Chow pendant 4 et 8 semaines, les foies des souris nourries avec un CDAA et un CSAA pendant (B) 2 semaines et (C) 5 semaines déterminées par RT qPCR. Corrélation entre l'expression de *Fat10* et les expressions de *Tnfa* et *Il6* dans les hépatocytes primaires isolés des foies de souris nourries avec un régime CDAA et un régime CSAA pendant 2 semaines déterminées par analyse transcriptomique. Les corrélations sont des régressions linéaires dont les droites sont représentées avec un intervalle de confiance à 95% (lignes pointillées). Le coefficient de corrélation, r , et la p -value, p sont indiqués.

iii. L'expression de *Fat10* corrèle négativement à celle de *Ppara* dans les hépatocytes murins lors du développement de la NASH

Afin d'étudier l'impact de *Fat10* sur l'expression et l'activité de *Ppara*, les expressions des deux gènes ont été corrélées à partir des données transcriptomiques obtenues sur les hépatocytes isolés des souris nourries au CDAA pendant 2 semaines. Ainsi, de façon similaire aux observations faites chez l'humain, l'expression de *Fat10* corrèle négativement à l'expression de *Ppara* dans les hépatocytes murins (**Fig. 29 (A)**). De plus, une analyse des voies de signalisation associées aux gènes négativement corrélés à *Fat10* a permis d'identifier les « Gene Ontology (GO) pathways » relatives au métabolisme des lipides et régulées par des gènes cibles de *Ppara*. En effet, la voie "Cholesterol metabolic process" qui inclut les gènes *Acaa2* et *Apoa1*, la voie "Triglycerides catabolic process" qui inclut *Fabp1* ou *Lipc* et la voie "Fatty acids β -oxidation" qui inclut notamment *Abcd3* et *Slc27a2* sont négativement corrélées à l'expression de *Fat10* (**Fig. 29 (B)**). Par ailleurs, le gène cible de *Ppara*, *Hmgcs2*, corrèle négativement à l'expression de *Fat10* dans les hépatocytes murins (**Fig. 29 (C)**). Ces résultats suggèrent une association entre l'inhibition de l'activité transcriptionnelle de *Ppara* et la surexpression de *Fat10* et ils valident la corrélation négative entre les expressions de *FAT10* et *PPAR α* observée dans les foies humains.

Finalement, ces constats laissent à penser que *Fat10* joue un rôle important dans la dysfonction métabolique des hépatocytes observée lors du développement de la maladie via la voie *Ppara*.

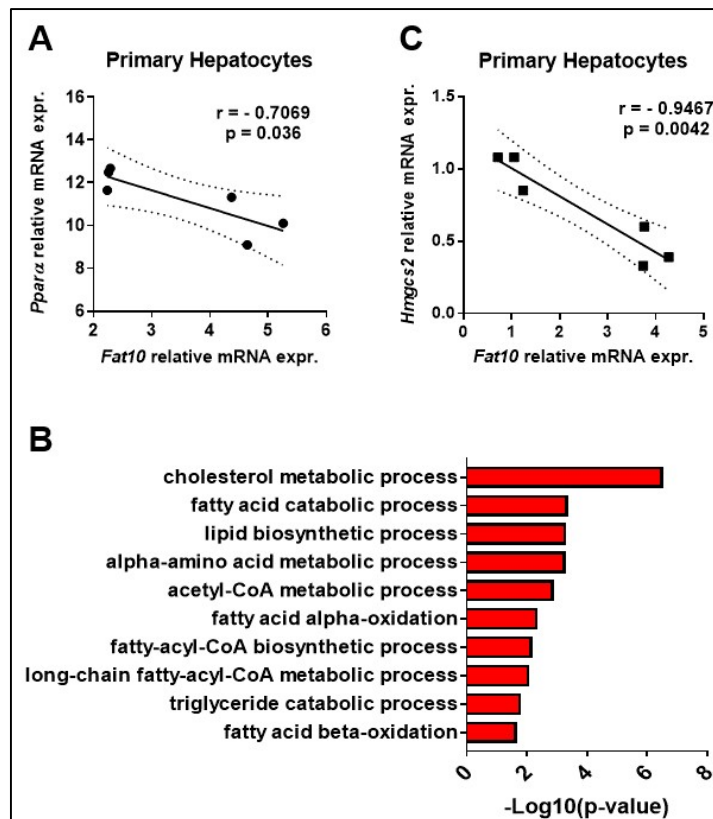


Figure 29 : L'expression de *Fat10* corrèle négativement avec l'expression de *Ppara* et de certains de ses gènes cibles.

Corrélation entre l'expression de *Fat10* et les expressions de (A) *Ppara* et (B) *Hmgcs2* dans les hépatocytes primaires isolés des foies de souris nourries avec un régime CDAA et un régime CSAA pendant 2 semaines déterminées par analyse transcriptomique. Les corrélations sont des régressions linéaires dont les droites sont représentées avec un intervalle de confiance à 95% (lignes pointillées). Le coefficient de corrélation, r , et la p-value, p sont indiqués. (C) GO-pathways obtenus à partir de la liste des gènes dont l'expression est négativement corrélée à l'expression de *Fat10* dans les hépatocytes primaires isolés des foies de souris nourries avec un régime CDAA et un régime CSAA pendant 2 semaines. Cette liste de gènes a été obtenue à partir de données transcriptomiques.

c. FAT10 interagit avec PPAR α dans les hépatocytes

i. *In vivo*

Par la suite, sachant que FAT10 interagit avec ses partenaires pour en moduler l'expression et l'activité (Aïchem A et al, *Nat Comm*, 2018), l'étude d'une potentielle interaction entre FAT10 et PPAR α a été réalisée *in vivo*. Pour cela, des marquages des interactions FAT10/PPAR α par la technique de Proximity Ligation Assay (PLA) ont été réalisés sur des coupes de foies humains et murins atteints de NASH. Les foies des souris nourries avec le régime CDAA pendant 2 semaines ont donc été marqués par la technique de PLA en immunohistochimie. Ainsi, l'observation des coupes révèle l'apparition de nombreux spots de couleur bordeaux pour les souris nourries avec le CDAA pendant 2 semaines ce qui n'est pas le cas pour les souris nourries avec le CSAA (Fig 30 (A)). Cette observation est retrouvée sur les foies humains, marqués par la technique de PLA en immunofluorescence, puisqu'une accumulation de spots fluorescents rouges est observée uniquement sur les coupes de foies de patients atteints de

NASH et non sur les coupes de foies des patients sains (**Fig 30 (B)**). De plus, pour les deux espèces, les interactions se localisent au niveau des noyaux des hépatocytes mais aussi dans le cytoplasme des cellules.

Ces observations témoignent d'une interaction entre FAT10 et PPAR α *in vivo*, dans les hépatocytes murins et humains en condition de NASH.

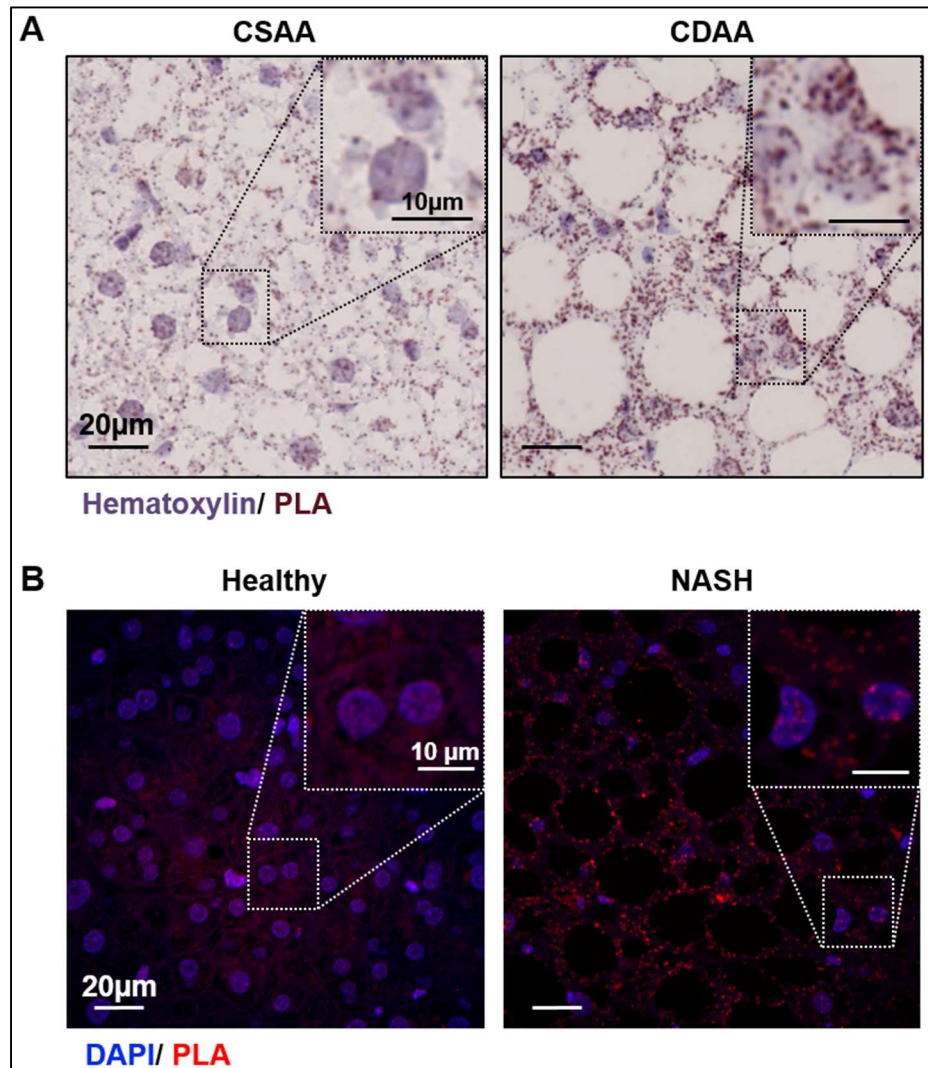


Figure 30 : FAT10 interagit avec PPAR α *in vivo* dans les foies humains et murins lors de la progression de la NASH.

Images représentatives de l'immunomarquage des interactions entre FAT10 et PPAR α sur des coupes **(A)** de foie de souris nourries pendant 2 semaines avec le CSAA (N=5) et le CDAA (N=5) et **(B)** des coupes de foie de patients « Healthy » (N=5 ; S<33% ; I, B et F=0) et de patients « NASH » (N=10 ; S>5% ; I>1 ; B=2 ; F<3). Les noyaux sont marqués en bleu (hématoxiline ou DAPI) et le marquage pour les interactions FAT10/PPAR α est obtenu par un kit de Proximity Ligation Assay (PLA) en rouge (lumière blanche ou Alexa 594). La barre d'échelle représente 20µm. En haut à gauche de chaque image, un zoom sur les cellules représentatives des cellules de la coupe est réalisé et la barre d'échelle représente 10µm.

ii. *In vitro*

Ayant établi l'interaction entre FAT10 et PPAR α dans les foies humains et murins atteints de NASH *in vivo*, l'étude de cette interaction a été menée *in vitro*. Pour cela, un modèle de surexpression endogène de FAT10 a été mis au point sur une lignée d'hépatocytes cancéreux, les HepG2, et non-cancéreux, les IHH, traitées avec un cocktail de cytokines TNF α / IFN γ . Ainsi, le traitement avec les cytokines induit une augmentation de l'expression génique et protéique de FAT10 mesurées respectivement par RT qPCR et par western blot dans les HepG2 (**Fig. 31 (A)**), et dans les IHH (**Fig. 31 (B)**). L'expression maximale de FAT10 est obtenue après 24 heures de traitement aux cytokines pour les deux lignées. De plus, l'activité de FATylation, connue comme le processus de fixation covalente de FAT10 sur ses partenaires, a été mesurée par western blot dans les HepG2. La figure 31 (C) montre que le nombre de protéines FATylées détectées par l'anticorps anti-FAT10 s'accroît dans les HepG2 après 24 heures de traitement aux cytokines traduisant une augmentation de la fixation de FAT10 à ses partenaires dans ces conditions (**Fig. 31 (C)**). L'immunomarquage de FAT10 et de PPAR α dans ces mêmes conditions montre que les protéines FAT10 et PPAR α colocalisent principalement dans le noyau mais aussi dans le cytoplasme des HepG2 traitées aux cytokines (**Fig. 31 (D)**).

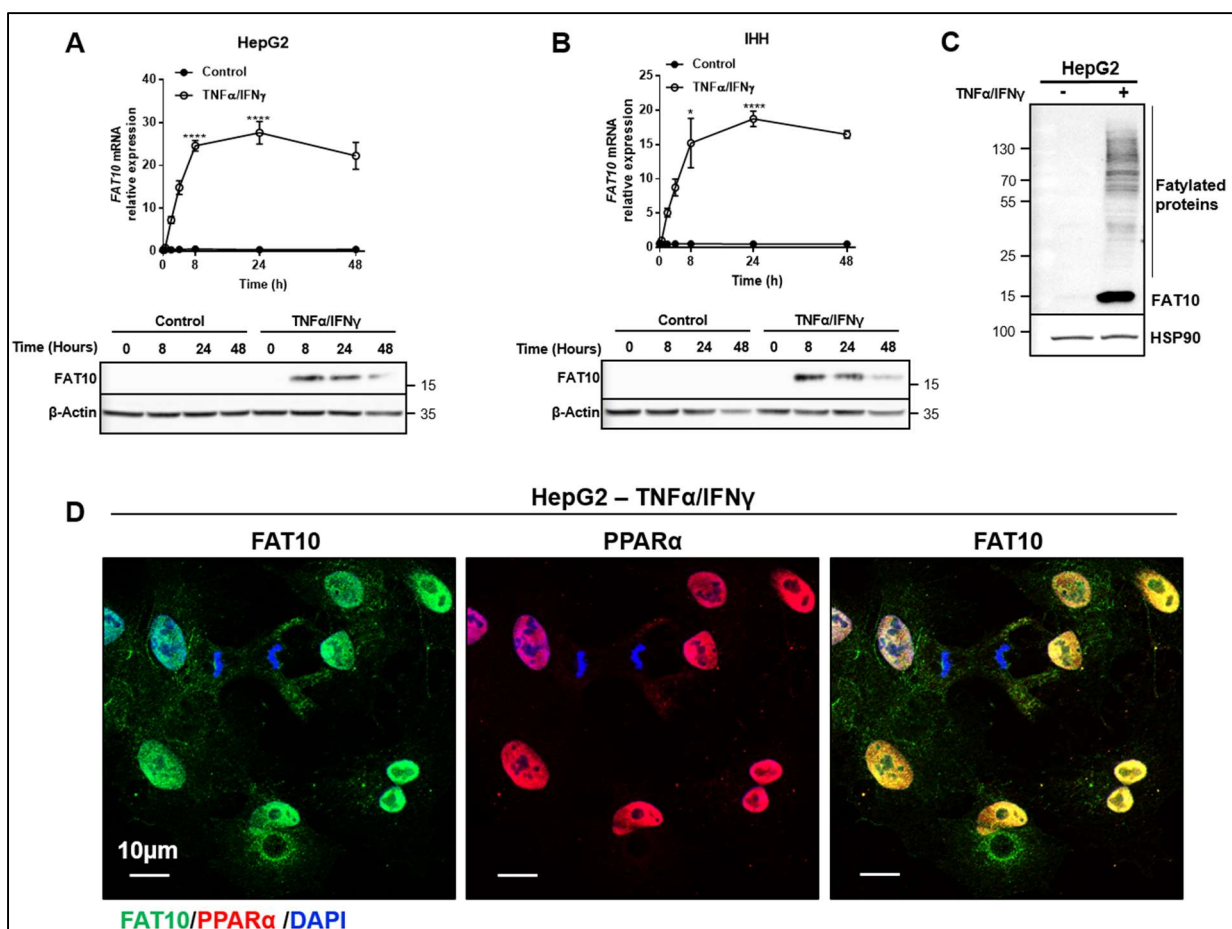


Figure 31 : FAT10 est surexprimé *in vitro* dans des lignées d'hépatocytes humains traités avec des cytokines pro-inflammatoires.

Expressions protéique et génique de *FAT10* au cours d'un traitement avec un cocktail de TNF α /IFN γ (50ng/mL / 10 ng/mL) de cellules **(A)** HepG2 et **(B)** IHH pendant 0, 2, 4, 8, 24 et 48 heures. **(C)** Mesure de l'expression des protéines FATylées par western blot dans les cellules HepG2 traitées avec TNF α /IFN γ (50ng/mL / 10 ng/mL) pendant 24 heures. **(D)** Images représentatives de l'immunomarquage FAT10 et PPAR α dans des cellules HepG2 traitées avec TNF α /IFN γ (50ng/mL / 10 ng/mL) pendant 24 heures. Les noyaux sont marqués en bleu (DAPI), le marquage spécifique de FAT10 est vert (Alexa 488) et le marquage spécifique de PPAR α est rouge (Alexa 594). La barre d'échelle représente 10 μ m.

Pour déterminer si la colocalisation de FAT10 et de PPAR α observée est due à une interaction entre les deux protéines, une co-immunoprécipitation (Co-IP) a été réalisée dans les HepG2 et les IHH traitées aux cytokines. De façon intéressante, PPAR α est détectée dans le lysat des protéines immunoprécipitées avec l'anticorps anti-FAT10 indiquant une interaction entre les deux protéines. Cette expérience étant menée en condition dénaturante, toute interaction non-covalente est rompue avant la détection par western blot. Or, la bande pour PPAR α est ici détectée aux alentours de 70 kDa, le poids moléculaire de FAT10 étant de 18kDa et celui de PPAR α de 55kDa, la bande peut être attribuée à un complexe covalent entre FAT10 et PPAR α ayant pour poids moléculaire la somme des deux (proche de 70kDa) dans les HepG2 et les IHH traitées aux cytokines (**Fig. 32 (A)**).

Afin de valider cette observation *in situ*, un marquage de l'interaction FAT10/PPAR α a été effectué par la technique de PLA sur les HepG2 traitées ou non aux cytokines. Comme observé sur la figure 32 (B) et mesuré par la quantification des spots fluorescents, le signal PLA est présent à l'état basal dans les HepG2 (**Fig 32 (B) et (C)**). Or, étant des cellules issues d'un hépatocarcinome, les HepG2 expriment *FAT10* à l'état basal. Néanmoins, cette expression est faible car les cellules sont positives pour p53 qui est connue pour réprimer le promoteur de *FAT10* (Zhang, Jeang and Lee, 2006). Même faiblement exprimée, la protéine FAT10 semble donc être capable de former des complexes avec PPAR α qui sont détectés par la technique de PLA, plus sensible que la technique de Co-IP. De façon intéressante, les interactions FAT10/PPAR α s'accumulent dans les conditions pro-inflammatoires induisant la surexpression de FAT10. Ces résultats valident donc l'interaction entre FAT10 et PPAR α observée par Co-IP. De plus, le signal est localisé dans les noyaux mais aussi dans le cytoplasme des cellules ce qui suggère une prise en charge de PPAR α par FAT10 dans ces deux compartiments cellulaires.

Par conséquent, *in vitro*, l'établissement d'un modèle cellulaire de surexpression de FAT10 en réponse à un traitement pro-inflammatoire a permis de démontrer qu'il existe une interaction entre FAT10 et PPAR α dans les hépatocytes et que ces interactions s'accumulent lors de la surexpression endogène de FAT10. De plus, cette interaction semble être covalente et se former dans le noyau et le cytoplasme des cellules.

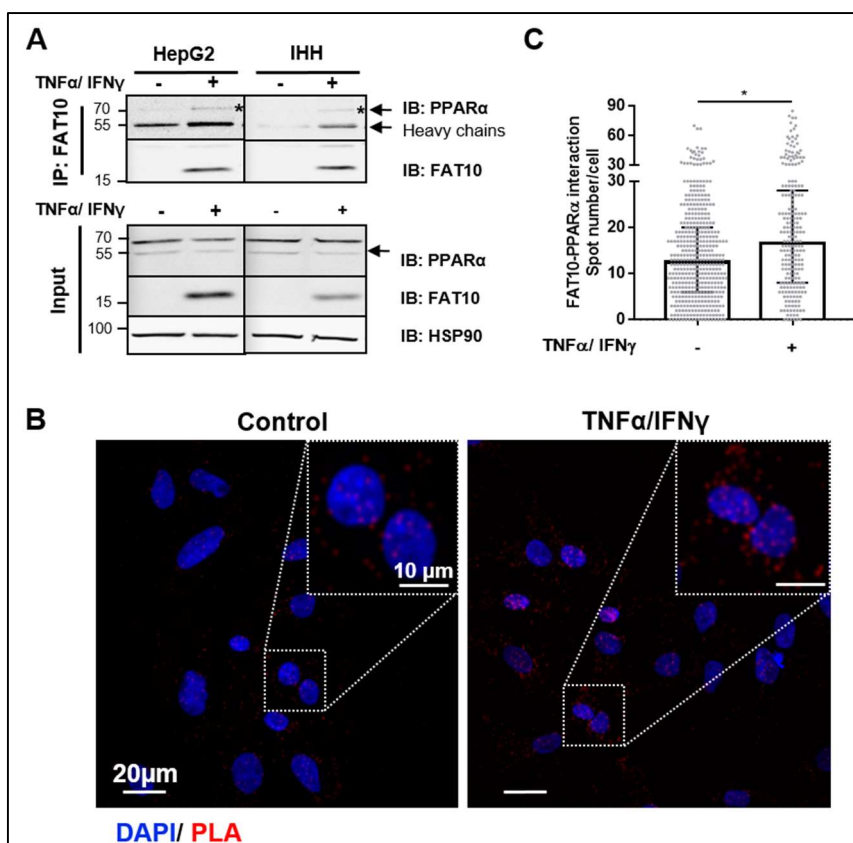


Figure 32 : FAT10 interagit avec PPARα *in vitro* dans les hépatocytes traités avec des cytokines pro-inflammatoires.

(A) Co-immunoprécipitation de FAT10 et PPARα à partir de lysat cellulaire de cellules HepG2 et IHH traitées ou non avec TNFα/IFNγ (50ng/mL / 10 ng/mL) pendant 24 heures. L'immunoprécipitation a été faite avec un anticorps anti-FAT10 (IP : FAT10) et le western blot avec un anticorps anti-PPARα (IB : PPARα), et anti-FAT10 (IB : FAT10). Le bas du pannel « input », désigne les western blots réalisés sur la fraction protéique totale. (B) Images représentatives de l'immunomarquage des interactions entre FAT10 et PPARα sur des cellules HepG2 traitées ou non avec TNFα/IFNγ (50ng/mL / 10 ng/mL) pendant 24 heures. Les noyaux sont marqués en bleu (DAPI) et le marquage spécifique des interactions FAT10/PPARα est obtenu par un kit de PLA en rouge (Alexa 594). La barre d'échelle représente 20µm. En haut à gauche de chaque image, un zoom sur les cellules représentatives des cellules de la coupe est réalisé et la barre d'échelle représente 10µm. (C) Quantification des spots de PLA dans les cellules HepG2 traitées ou non avec TNFα/IFNγ (50ng/mL / 10 ng/mL) pendant 24 heures. Médiane ± écart interquartile. T-test de Student, * p<0,05.

iii. L'inhibition des voies de dégradation stabilise les complexes FAT10/ PPARα sans moduler l'expression protéique de PPARα

Afin de mieux comprendre le mécanisme d'action de FAT10 sur PPARα, et sachant que FAT10 interagit avec ses partenaires principalement pour les dégrader, l'impact des voies de dégradation sur le devenir des complexes FAT10/PPARα a été étudié. Pour cela, des HepG2 ont été traitées pendant 6 heures avec un inhibiteur du 26S protéasome, le MG132, puis les interactions FAT10/PPARα ont été marquées par PLA et quantifiées par une technique de détection de spots. Dans les HepG2 à l'état basal, l'inhibition de la dégradation protéasomale induit une accumulation du nombre d'interaction FAT10/PPARα (Fig. 33 (A)). Ce résultat est attendu puisque le MG132 stabilise FAT10 dans les HepG2

(Kalveram, Schmidtke and Groettrup, 2008) en inhibant sa dégradation par le protéasome. FAT10 est donc plus disponible pour interagir avec ses partenaires, dont PPAR α . L'expression protéique de PPAR α est également stabilisée par un traitement au MG132 ce qui favorise d'autant plus les interactions FAT10/PPAR α (Blanquart *et al.*, 2002). Cette observation est reproduite dans les conditions inflammatoires de surexpression endogène de FAT10. En effet, les cellules traitées au TNF α /IFN γ pendant 24 heures puis traitées au MG132 présentent une accumulation des interactions FAT10/PPAR α (**Fig. 33 (B)**). Ces résultats démontrent donc que l'inhibition du protéasome stabilise les complexes FAT10/PPAR α en condition basale et lors de la surexpression de FAT10, suggérant une implication de cette voie de dégradation dans le mécanisme d'action de FAT10 sur PPAR α .

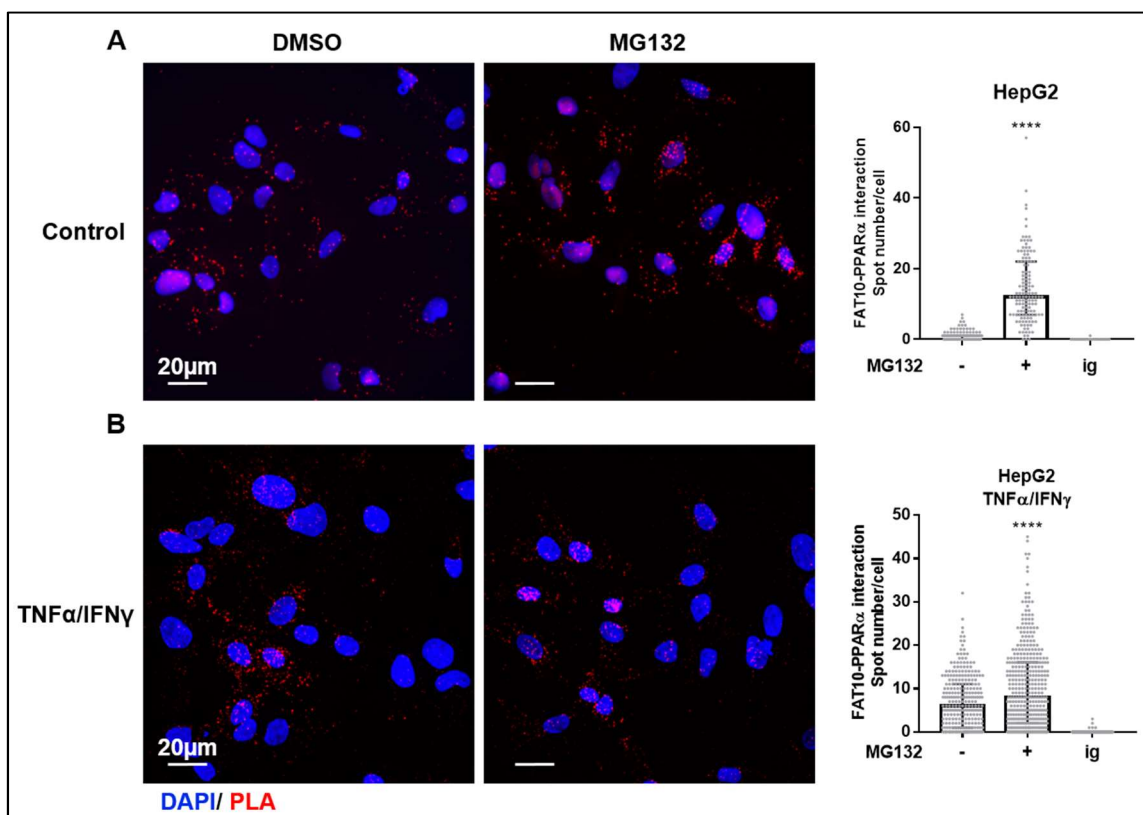


Figure 33 : L'inhibition du protéasome induit l'accumulation des interactions FAT10/PPAR α dans les hépatocytes.

Images représentatives de l'immunomarquage des interactions entre FAT10 et PPAR α sur des cellules HepG2 (**A**) traitées (**B**) ou non avec TNF α /IFN γ (50ng/mL / 10 ng/mL) pendant 18 heures puis 6 heures avec un inhibiteur du protéasome (MG132, 10 μ M). Les noyaux sont marqués en bleu (DAPI) et le marquage spécifique des interactions FAT10/PPAR α est obtenu par un kit de PLA en rouge (Alexa 594). La barre d'échelle représente 20 μ m. Les quantifications des spots de PLA ont été réalisées. Médiane \pm écart interquartile. T-test de Student, **** $p < 0,0001$.

Cependant, FAT10 est aussi capable de rediriger ses substrats vers la voie de dégradation lysosomale via son interaction avec la chaperonne HDAC6 lorsque la voie de dégradation protéasomale est inhibée (Kalveram, Schmidtke and Groettrup, 2008). Ainsi, dans l'objectif de voir si cette compensation intervient dans notre modèle, l'interaction FAT10/HDAC6 a été marquée par PLA dans

les HepG2 traitées avec le MG132 puis les interactions ont été quantifiées comme précédemment. L'inhibition du protéasome par le MG132 induit une augmentation du nombre de spots de PLA indiquant qu'une interaction entre FAT10 et HDAC6 se produit dans les HepG2 lorsque le protéasome est inhibé. Ces résultats montrent donc que FAT10 et les protéines FATylées peuvent emprunter la voie de dégradation lysosomale en compensation lors d'une inhibition de la voie du protéasome (**Fig. 34**).

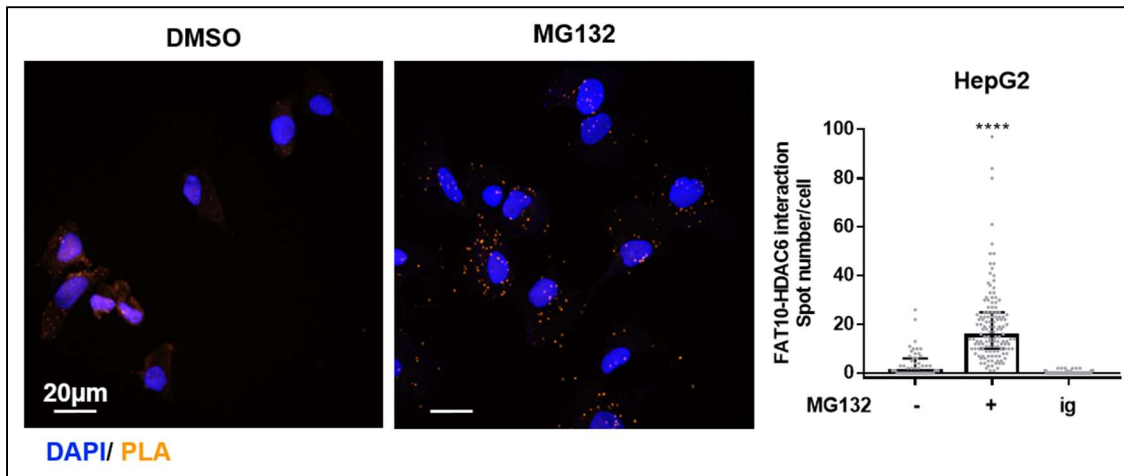


Figure 34 : L'inhibition du protéasome favorise l'interaction entre FAT10 et HDAC6 dans les hépatocytes.

Images représentatives de l'immunomarquage des interactions entre FAT10 et HDAC6 sur des cellules HepG2 traitées ou non avec le MG132 (10µM) pendant 6 heures. Les noyaux sont marqués en bleu (DAPI) et le marquage spécifique des interactions FAT10/HDAC6 est obtenu par un kit de PLA en orange (Alexa 594). La barre d'échelle représente 20µm. Les quantifications des spots de PLA ont été réalisées. Médiane \pm écart interquartile. T-test de Student, **** $p < 0,0001$.

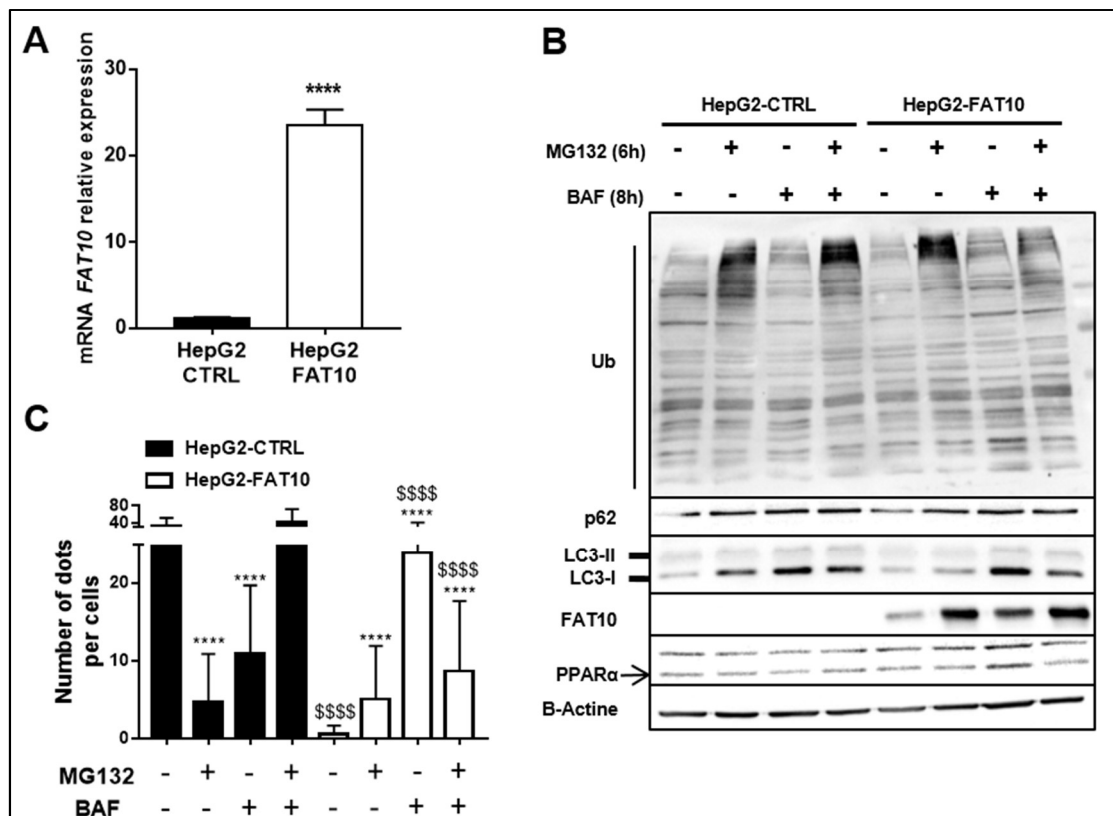
Ainsi, l'impact des deux voies de dégradation sur le devenir des complexes FAT10/PPAR α a été étudié. Pour cela, les voies protéasomale et/ ou lysosomale ont été inhibées. Pour cela, des cellules HepG2 ont été traitées avec le MG132 pendant 6 heures et/ou la Bafylomycine A1 (BAF), pendant 8 heures. Le modèle de surexpression de FAT10 présenté précédemment fait intervenir un traitement pro-inflammatoire connu pour perturber les voies de dégradation. Ainsi, afin de s'affranchir de l'impact des cytokines sur les voies de dégradation, un modèle de cellules HepG2 surexprimant stablement FAT10 suite à une infection par un lentivirus FAT10 (HepG2-FAT10, **Fig. 35 (A)**) et de cellules HepG2 contrôles, infectées avec un lentivirus de surexpression de la GFP (HepG2-CTRL) a été mis au point. Le contrôle de l'inhibition du protéasome par le MG132 a été effectué par la mesure de l'accumulation des protéines ubiquitinylées par western blot. Ainsi, le traitement au MG132 pendant 6 heures, seul ou combiné à la BAF, induit bien une accumulation des protéines ubiquitinylées que ce soit dans les cellules HepG2-CTRL ou HepG2-FAT10 (**Fig. 35 (B)**). Il est à noter que l'accumulation d'ubiquitine semble moins importante dans les cellules HepG2-FAT10 lorsque le MG132 est combiné à la BAF ce

qui suggère une inhibition moins efficace de la dégradation protéasomale dans les cellules surexprimant FAT10 stablement traitées à la BAF. Ensuite, l'efficacité de l'inhibition de l'autophagie par la BAF a été contrôlée par la mesure de la conversion de LC3I en LC3II et par l'accumulation de p62 par western blot. Ainsi, le traitement à la BAF, seul ou combiné au MG132, induit bien une accumulation de LC3 II par rapport à LC3 I dans les HepG2-CTRL et dans les HepG2-FAT10. La protéine p62 s'accumule lors de l'inhibition des voies de dégradation individuellement ou conjointement. Or, p62 est dégradée via l'autophagie mais aussi via la voie protéasomale. Par conséquent, son accumulation valide l'inhibition des voies lysosomale et/ ou protéasomale dans les HepG2-CTRL et HepG2-FAT10 (**Fig. 35 (B)**).

Ensuite, les expressions de FAT10 et de PPAR α ont été mesurées dans ces mêmes conditions par western blot. Comme attendu, l'expression de FAT10 est fortement augmentée dans les cellules HepG2-FAT10 et elle est stabilisée par les inhibiteurs du protéasome et de l'autophagie seuls ou combinés. Enfin, en condition basale, l'expression de PPAR α est la même dans les cellules HepG2-CTRL et HepG2-FAT10. Cependant, la protéine semble être légèrement stabilisée lors de l'inhibition de l'autophagie uniquement dans les cellules surexprimant FAT10 (**Fig. 35 (B)**). Il semble donc que l'inhibition des voies de dégradation ait peu d'impact sur la dégradation protéique de PPAR α dans ce modèle cellulaire. De plus, la surexpression stable de FAT10 ne semble pas non plus favoriser la dégradation de PPAR α .

Afin d'observer l'impact des inhibiteurs des voies de dégradation sur les complexes FAT10/PPAR α , les interactions ont été marquées par PLA puis quantifiées. De façon surprenante, un nombre élevé de signaux PLA est détecté dans les cellules HepG2-CTRL non-traitées (**Fig. 35 (C) et (D)**). En effet, environ 40 interactions par cellules sont détectées dans ces conditions alors que seulement une dizaine d'interactions sont détectées dans les HepG2 sauvages en condition basale. De façon plus surprenante, l'inhibition du protéasome ou du lysosome dans ces cellules fait diminuer le nombre d'interactions FAT10/PPAR α et, lors de l'inhibition combinée des deux voies, le nombre de complexes FAT10/PPAR α revient au niveau de la condition contrôle. Ce résultat est contradictoire avec ce qui est observé dans les HepG2 sauvages pour lesquelles l'inhibition de la voie protéasomale augmente le nombre d'interactions. D'autre part, à l'état basal, les HepG2-FAT10 présentent très peu de spots fluorescents spécifiques des complexes FAT10/PPAR α . Lorsque les cellules HepG2-FAT10 sont traitées avec les inhibiteurs des voies de dégradation seuls les interactions FAT10/ PPAR α s'accumulent. Cette augmentation du nombre d'interactions est plus importante lorsque l'autophagie est inhibée (**Fig. 35 (C) et (D)**). Étonnamment, lorsque les deux inhibiteurs sont combinés, le nombre d'interactions accumulées n'est pas supérieur à celui obtenu lors de l'inhibition de l'autophagie seule. Cette observation est peut-être due à une inhibition incomplète du protéasome puisque l'accumulation de protéines ubiquitinylées observée par western blot lors de la combinaison des deux inhibiteurs dans

les HepG2-FAT10 est moins importante que pour les HepG2-CTRL. Ces résultats peuvent s'expliquer par le fait que la surexpression stable de FAT10 favorise fortement l'interaction de l'ubiquitin-like avec ses partenaires et donc sa dégradation. Ainsi, la vitesse de « turnover » de la protéine FAT10 ainsi que celle des complexes FAT10/PPAR α est probablement augmentée ce qui rend les protéines plus fugaces et plus difficiles à marquer *in situ*. L'inhibition des voies de dégradation bloque ce « turnover » et stabilise FAT10 ainsi que les complexes FATylés ce qui est cohérent avec le fait que le traitement par les inhibiteurs des voies de dégradations induit une accumulation des complexes FAT10/PPAR α .



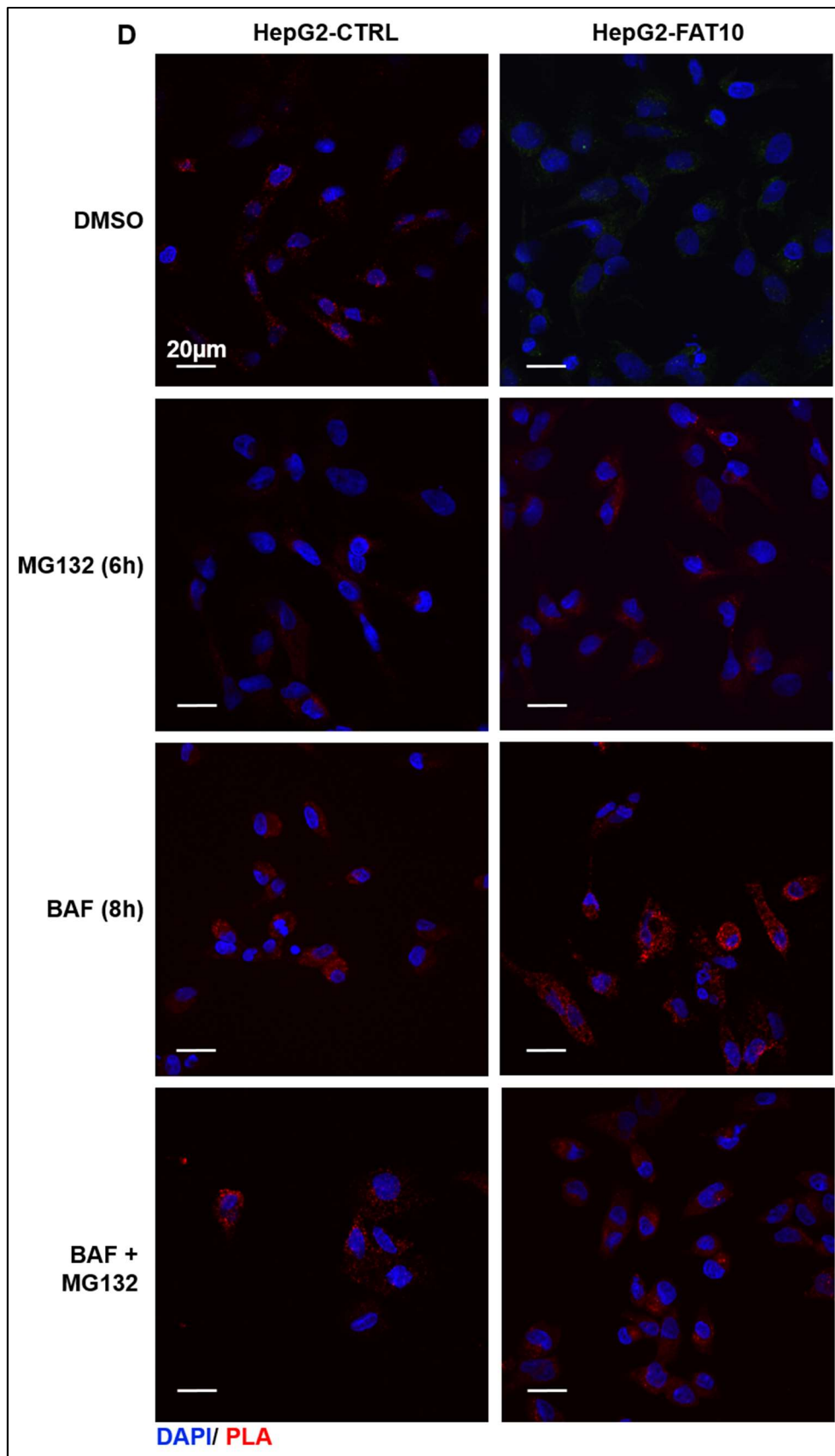


Figure 35 : L'inhibition des voies de dégradation module le nombre d'interaction FAT10/PPAR α dans les hépatocytes surexprimant stablement FAT10.

(A) Mesure de l'expression en ARNm de FAT10 dans les cellules HepG2 surexprimant stablement FAT10 (HepG2-FAT10) et les HepG2 contrôles (HepG2-CTRL). Les cellules HepG2-FAT10 et HepG2-CTRL ont été soit pré-traitées avec un inhibiteur de l'autophagie (la Bafylomycine, BAF, 100nM) pendant 2 heures puis avec la BAF combinée au MG132 (10µM) pendant 6 heures soit traitées avec la BAF (100nM, 8 heures) et le MG132 (10µM, 6 heures) seuls puis **(B)** les expressions protéiques de FAT10, PPARα, l'ubiquitine (Ub), p62 et LC3 ont été mesurées par western blot et **(D)** les images représentatives de l'immunomarquage des interactions entre FAT10 et PPARα sur ces ont été réalisées. Les noyaux sont marqués en bleu (DAPI) et le marquage spécifique des interactions FAT10/PPARα est obtenu par un kit de PLA en rouge (Alexa 594). La barre d'échelle représente 20µm. **(C)** Les quantifications des spots de PLA ont été réalisées. Médiane ± écart interquartile. T-test de Student, **** p<0,0001.

Finalement, ces résultats sont contradictoires avec ce qui est observé dans le modèle de surexpression endogène de FAT10. Cependant, une variation du nombre d'interactions est observée dans les deux modèles d'HepG2 en réponse à l'inhibition des voies de dégradation, que la surexpression de FAT10 soit endogène ou exogène. Ces données démontrent donc une implication des voies de dégradation dans le devenir des complexes FAT10/PPARα. L'étude du mécanisme d'action de FAT10 sur PPARα nécessite l'implémentation d'un nouveau modèle cellulaire de surexpression de FAT10 qui permette de s'affranchir de la condition pro-inflammatoire et de reproduire les résultats obtenus dans le modèle de surexpression endogène de FAT10 et les modèles de NASH *in vivo*.

Ainsi, ces résultats identifient une nouvelle modification post-traductionnelle pour PPARα dans le contexte de la NASH, et suggèrent un rôle pour FAT10 dans la modulation de PPARα dans ce contexte.

d. FAT10 régule négativement le métabolisme des lipides en inhibant l'activité transcriptionnelle de PPARα *in vitro*

i. Diminuer l'expression de FAT10 favorise l'activité de PPARα et le métabolisme des lipides associé

Pour mieux comprendre le rôle de FAT10 dans la modulation de l'activité et de l'expression de PPARα, l'expression de FAT10 a été diminuée *in vitro* dans une lignée d'hépatocytes. Pour cela, les HepG2 ont été transfectées avec un siARN ciblant FAT10 (siFAT10) puis traitées avec le cocktail TNFα/IFNγ pendant 24 heures. La mesure de l'expression de FAT10, de PPARα et de certains de ses gènes cibles par RT qPCR a permis d'observer que la diminution de l'expression de FAT10 par le siFAT10 induit une légère augmentation de l'expression de PPARα (**Fig. 36 (A)**). De plus, la transfection avec le siFAT10 provoque une augmentation de l'expression de certains gènes cibles de PPARα comme HMGCS2, augmenté de 2 fois, et PDK4, augmenté de 4 fois (**Fig. 36 (B)**) suggérant une activité transcriptionnelle plus efficace pour PPARα quand FAT10 est inhibé. Cependant, ces gènes cibles

peuvent aussi être régulés indépendamment de PPAR α , et afin de vérifier si les effets observés sont dépendants du récepteur nucléaire, le siFAT10 a été combiné à un siARN ciblant PPAR α (siPPAR α) puis les cellules HepG2 ont été traitées avec le TNF α et l'IFN γ pendant 24 heures. La mesure des expressions de *FAT10*, *PPAR α* et de ses gènes cibles a été réalisée par RT qPCR. Ainsi, la transfection avec le siPPAR α diminue bien l'expression de *PPAR α* et n'a pas d'impact significatif sur l'expression de *FAT10*. De façon intéressante, l'augmentation de l'expression des gènes cibles de PPAR α , observée avec le siFAT10 seul, n'est pas retrouvée lorsque les cellules sont transfectées avec le siFAT10 et le siPPAR α simultanément (**Fig. 36 (B)**). Ces observations démontrent donc que la diminution de l'expression de *FAT10* favorise la transcription des gènes cibles de PPAR α de façon PPAR α dépendante ce qui suggère que FAT10 régule négativement l'activité transcriptionnelle de PPAR α .

Par la suite, la même stratégie de transfection avec les siARN ciblant FAT10 et PPAR α a été reproduite afin de mesurer l'impact de la diminution de l'expression de FAT10 sur le métabolisme des lipides dépendant de PPAR α . Pour cela, des tests fonctionnels ont été effectués : la mesure du contenu lipidique des cellules a été réalisée par un marquage BODIPY et la capacité respiratoire mitochondriale des hépatocytes a été mesurée par la technique Seahorse. Ainsi, la diminution de l'expression de *FAT10* par le siFAT10 induit une diminution du nombre de gouttelettes lipidiques stockées dans les cellules HepG2 par rapport aux cellules contrôles (**Fig. 36 (D) et (E)**). Cependant, ce résultat n'est pas retrouvé lorsque les siARN ciblant FAT10 et PPAR α sont transfectés simultanément. De même, la diminution de l'expression de FAT10 induit une augmentation de la respiration mitochondriale maximale des cellules (augmentation de la consommation d'oxygène (OCR : oxygen consumption rate)), traduisant une β -oxydation plus efficace des acides gras, qui n'est pas retrouvée lorsque les expressions de *FAT10* et de *PPAR α* sont diminuées simultanément (**Fig. 36 (C)**). Ces observations montrent donc que lorsque l'expression de *FAT10* est diminuée, les hépatocytes ont un métabolisme des lipides dépendant de PPAR α plus efficace. Cela suggère un impact fonctionnel de la régulation de l'activité de PPAR α par FAT10.

Les précédentes observations indiquent donc que l'inhibition de l'expression de *FAT10* dans les hépatocytes promeut l'activité transcriptionnelle de PPAR α ce qui a pour conséquence de favoriser le métabolisme des lipides dépendant de PPAR α .

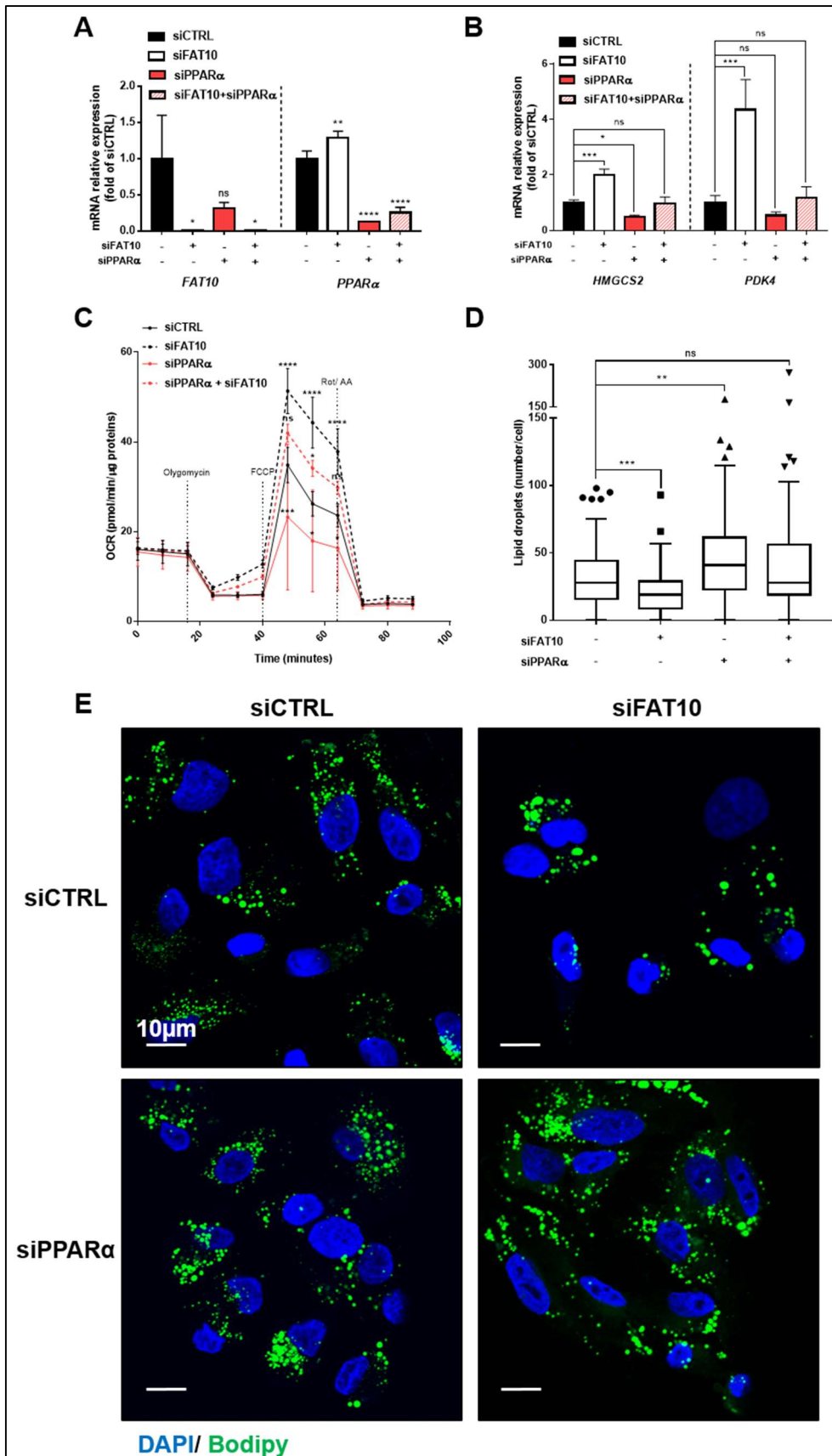


Figure 36 : La diminution de l'expression de FAT10 *in vitro* favorise l'activité transcriptionnelle de PPARα dans les hépatocytes.

Les cellules HepG2 ont été transfectées avec un siARN contrôle (siCTRL) ou un siARN ciblant FAT10 (siFAT10) seul ou combiné à un siARN ciblant PPAR α (siPPAR α) pendant 24 heures puis ces cellules sont traitées avec TNF α /IFN γ (50ng/mL / 10 ng/mL) pendant 24 heures. **(A)** Mesure des expressions ARNm de *FAT10*, *PPAR α* et **(B)** *HMGCS2* et *PDK4*, deux gènes cibles de PPAR α . Moyenne \pm SD. **(C)** Mesure de l'OCR (Oxygen Consumption Rate) dans les cellules HepG2 transfectées avec le siCTRL ou le siFAT10 combiné ou non au siPPAR α pendant 48 heures et incubées pendant 1 heure dans le milieu Seahorse supplémenté avec du pyruvate (1mM), glutamine (200mM) et glucose (10mM). La mesure est faite au court du temps après un traitement avec l'oligomycine (2 μ M ; 16 minutes), puis le FCCP (1 μ M ; 40 minutes) et un mélange roténone/ antimycine A (Rot/AA ; 0,5M ; 64 minutes). Moyenne \pm SD. Le marquage des gouttelettes lipidiques par BODIPY a été réalisé. **(D)** Quantification du nombre de gouttelettes par cellule. Médiane \pm écart interquartile, représentées sous forme de boîte à moustache de Tukey. **(E)** Images représentatives du marquage. Les noyaux sont marqués en bleu (DAPI) et le marquage spécifique des gouttelettes lipidiques en vert (BODIPY 493/503). La barre d'échelle représente 10 μ m. Two-way ANOVA suivie d'un test de Bonferroni siCTRL vs siARN ns non-significatif ; * p<0,05 ; ** p<0,01 ; *** p<0,001 ; **** p<0,0001.

ii. Surexprimer FAT10 réprime l'activité de PPAR α et le métabolisme des lipides associé

Dans l'objectif de valider les résultats précédents, l'impact de la surexpression de FAT10 sur l'activité de PPAR α a été étudié *in vitro*. Les résultats précédents ont été obtenus grâce à un modèle de surexpression endogène de FAT10 suite à un traitement pro-inflammatoire, or, l'inflammation peut induire de nombreuses voies interférant avec le métabolisme des hépatocytes (Daniel *et al.*, 2021). Ainsi, pour s'affranchir de ce statut pro-inflammatoire, le modèle de surexpression exogène et stable de FAT10 (HepG2-FAT10) précédemment décrit a été utilisé.

La mesure de l'expression de PPAR α et de certains de ses gènes cibles a été réalisée par qPCR. Les cellules qui surexpriment stablement *FAT10* présentent une diminution de l'expression de PPAR α ainsi que de certains de ces gènes cibles impliqués dans l'oxydation des acides gras comme *EHHADH* ou dans la cétogenèse, comme *HMGCS2* (**Fig. 37 (A)**). De plus, la mesure du nombre de gouttelettes lipidiques a été effectuée, par un marquage BODIPY et montre que, contrairement aux cellules transfectées avec le siFAT10, les cellules surexprimant stablement FAT10 accumulent plus de gouttelettes lipidiques que les cellules contrôles (**Fig. 37 (B) et (C)**). Enfin, les HepG2-FAT10 présentent une respiration basale et maximale diminuée par rapport aux cellules contrôles. De façon intéressante, cette observation est exacerbée lorsque les cellules sont déprivées en sérum et incubées avec 500 μ M d'acide palmitique (**Fig. 37 (D)**). Cette observation démontre que les mitochondries des HepG2-FAT10 respirent moins efficacement lorsque la seule source d'énergie disponible est le palmitate et suggère donc un défaut d'utilisation des lipides par les cellules qui surexpriment FAT10.

Ainsi, les observations précédentes démontrent que la surexpression de FAT10 inhibe l'activité transcriptionnelle de PPAR α ce qui se répercute sur le métabolisme des lipides associé. De plus, ces résultats valident les observations faites en condition d'inhibition de FAT10.

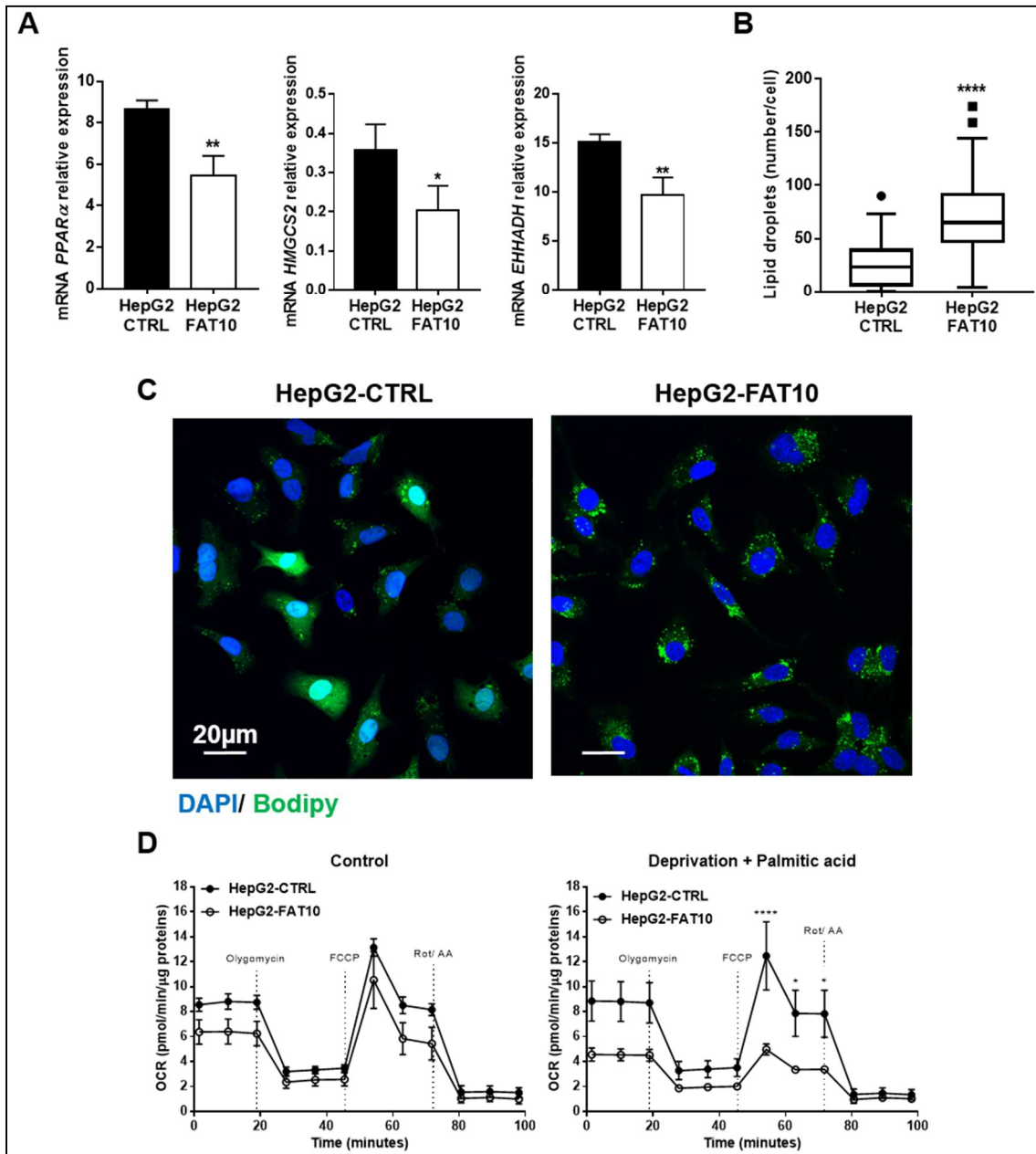


Figure 37 : La surexpression de FAT10 *in vitro* réprime l'activité transcriptionnelle de PPAR α dans les hépatocytes.

(A) Mesure des expressions ARNm de PPAR α , HMGCS2 et EHHADH, deux gènes cibles de PPAR α dans les cellules HepG2-FAT10 et HepG2-CTRL. Moyenne \pm SD. Le marquage des gouttelettes lipidiques par BODIPY a été réalisé dans les cellules HepG2-FAT10 et HepG2-CTRL. (B) Quantification du nombre de gouttelettes par cellule. Médiane \pm écart interquartile, représentées sous forme de boîte à moustache de Tukey. (C) Images représentatives du marquage. Les noyaux sont marqués en bleu (DAPI) et le marquage spécifique des gouttelettes lipidiques en vert (BODIPY 493/503). La barre d'échelle représente 20 μ m. (D) Mesure de l'OCR (Oxygen Consumption Rate) dans les cellules HepG2-CTRL et HepG2-FAT10 cultivées dans leur milieu de culture complet (pannel de gauche) ou un milieu sans sérum (pannel de droite) incubées pendant 1 heure dans le milieu Seahorse supplémenté avec du pyruvate (1mM), glutamine (200mM) et glucose (10mM) avec ou sans acide palmitique (0,5mM dans une solution de BSA). La mesure est faite au court du temps après un traitement avec l'oligomycine (2 μ M ; 16 minutes), puis le FCCP (1 μ M ; 40 minutes) et un mélange roténone/ antimycine A (Rot/AA ; 0,5M ; 64 minutes). Moyenne \pm SD. T-test de Student * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$.

e. La surexpression de Fat10 *in vivo* inhibe l'activité de Ppar α en réponse au jeûne

i. Etablissement d'un modèle *in vivo* de surexpression de Fat10

Ayant observé un impact de l'expression de FAT10 sur l'activité de PPAR α dans les hépatocytes *in vitro*, la question de l'impact de Fat10 sur l'activité de Ppar α *in vivo* a été étudiée. Pour cela, des souris C57Bl6/J mâles ont été infectées avec un adénovirus permettant la surexpression de Fat10 (Ad-FAT10) ou avec un adénovirus contrôle (Ad-CTRL). Après 4 jours d'infection, les souris ont été soumises à une période de jeûne de 18 heures connue pour activer Ppar α (Kersten *et al.*, 1999), puis les animaux ont été mis à mort afin de prélever leur sang et leurs organes.

L'expression protéique de Fat10 a d'abord été détectée par un immunomarquage fluorescent rouge sur des coupes de foies des souris infectées avec l'Ad-FAT10 ou l'Ad-CTRL. La figure 38 (A) montre que le marquage Fat10 est plus intense dans le foie des souris Ad-FAT10 indiquant une forte expression de la protéine Fat10 suite à l'infection. De plus, le marquage est diffus et semble se localiser en majorité dans le cytoplasme des hépatocytes (Fig. 38 (A)). Ensuite, la mesure de l'expression de *Fat10* a été réalisée par RT qPCR dans le foie des souris infectées avec l'Ad-FAT10 et l'Ad-CTRL nourries ou mises à jeun. Les résultats montrent que l'expression de *Fat10* est augmentée de 100 fois chez les souris nourries *ad libitum* et d'environ 200 fois chez les souris à jeun confirmant la forte surexpression de *Fat10* dans le foie des souris infectées avec l'Ad-FAT10 à l'échelle génique (Fig. 38 (B)).

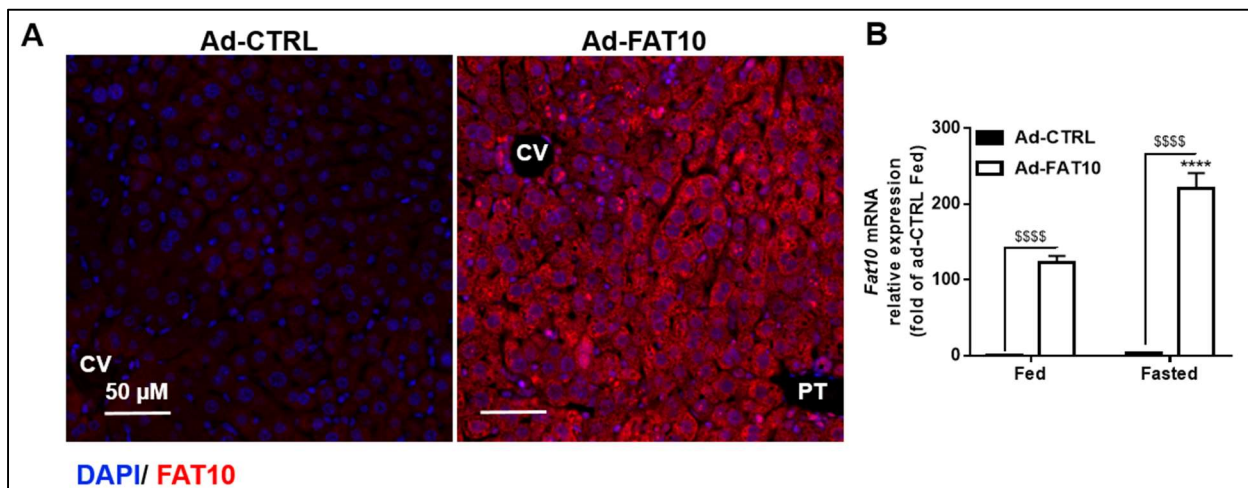
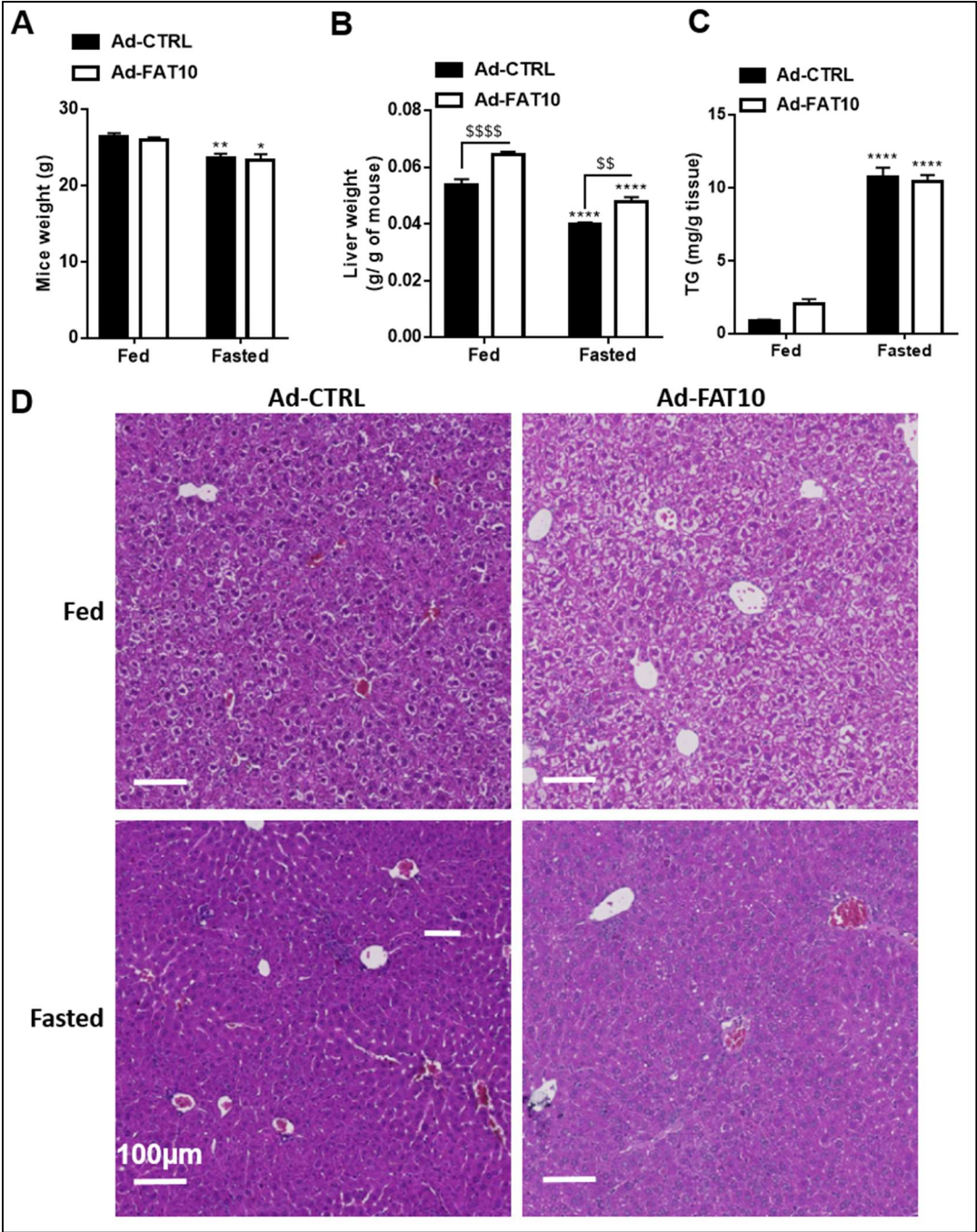


Figure 38 : Fat10 est surexprimée dans les foies des souris infectées avec l'Ad-FAT10.

Des souris C57Bl6/J ont été infectées avec un adénovirus contrôle (Ad-CTRL) ou induisant la surexpression de Fat10 (Ad-FAT10) pendant 4 jours. Puis ces souris ont été nourries ad-libitum (« Fed » Ad-CTRL N=10 ; Ad-FAT10 N=9) ou mises à jeun pendant 18h (« Fasted » Ad-CTRL N=10 ; Ad-FAT10 N=10). **(A)** Images représentatives de l'immunomarquage Fat10 sur des coupes de foie des souris Fasted Ad-CTRL (N=5) et Ad-FAT10 (N=5). Les noyaux sont marqués en bleu (DAPI) et le marquage spécifique de Fat10 est obtenu par un kit d'amplification Tyramide rouge (Alexa 594). Les veines centrales et les triades portales sont respectivement indiquées par « CV » et « PT » sur les images. La barre d'échelle représente 50µm. **(B)** Mesure de l'expression ARNm de *Fat10* dans le foie total de souris Fed et Fasted infectées avec l'adénovirus contrôle et l'adénovirus Fat10. Les résultats exprimés par rapport à l'expression de Fat10 mesurée dans les foies des souris Ad-CTRL Fed à laquelle a été attribuée la valeur 1. Moyennes ± SEM. Two-way ANOVA suivie d'un test de Bonferroni. Ad-CTRL vs Ad-FAT10 \$\$\$\$ p<0,0001 ; Fed vs Fasted **** p<0,0001.

Afin de caractériser le phénotype de ces souris, la mesure de leur masse corporelle, de la masse de leur foie, le dosage des lipides hépatiques et plasmatiques ainsi que la mesure de leur glycémie, de la concentration en ASAT et ALAT ont été effectués. Tout d'abord, la surexpression de Fat10 n'a pas d'impact sur le poids des souris après l'injection ni sur la perte de poids induite par la période de jeûne de 18 heures (**Fig. 39 (A)**). Le poids du foie des souris est diminué par le jeûne, comme attendu, mais les souris infectées avec l'Ad-FAT10, qu'elles soient nourries ou à jeun, ont un foie plus lourd que les souris infectées avec l'Ad-CTRL (**Fig. 39 (B)**). Cette observation pourrait être due à une augmentation du contenu lipidique des foies des souris infectées avec l'Ad-FAT10. Or, aucune macrostéatose n'est observée sur les coupes de foie de ces souris marquée par H&E (**Fig. 39 (D)**) et le dosage des TG hépatiques ne montre pas de différence entre les souris Ad-CTRL et Ad-FAT10 (**Fig. 39 (C)**) indiquant qu'il n'y a pas d'accumulation de lipides chez les souris surexprimant Fat10. Ensuite, le dosage du glucose circulant montre une diminution de la glycémie en réponse au jeûne de 18 heures et aucune différence n'est observée entre les souris infectées avec l'Ad-CTRL ou l'Ad-FAT10 (**Fig. 39 (E)**). Les concentrations circulantes en FFA, quant à elles, sont augmentées en réponse au jeûne ce qui n'est pas surprenant puisque, dans ces conditions, la lipolyse du tissu adipeux est induite et favorise la sécrétion de lipides dans la circulation. Or, pour les souris injectées avec l'Ad-FAT10, les concentrations plasmatiques en FFA sont supérieures à celles des souris injectées avec l'Ad-CTRL que les souris soient nourries ou à jeun. De plus, la concentration en TG circulants des souris Ad-FAT10 est également plus élevée que celle des souris Ad-CTRL mais uniquement en condition de jeûne (**Fig. 39 (E)**). Ces résultats pourraient s'expliquer par une activation plus importante de la lipolyse au niveau du tissu adipeux pour les souris surexprimant Fat10, ce qui se traduirait par une diminution plus importante du poids du tissu adipeux en réponse au jeûne pour ces souris. Or, le poids des tissus adipeux prélevés qui diminue en réponse au jeûne, n'est pas différent entre les souris Ad-FAT10 et Ad-CTRL ce qui invalide cette hypothèse (**Fig. 39 (F)**). Enfin, la mesure des enzymes hépatiques a également été réalisée sur le plasma de ces souris. Les concentrations en ASAT et ALAT, pour les souris infectées avec l'Ad-CTRL, sont respectivement d'environ 50 U/L et 30 U/L, qui sont des valeurs comparables à celles observées chez des souris contrôles. Par contre, les concentrations en ASAT et ALAT sont augmentées dans le plasma

par l'infection avec l'Ad-FAT10, quelle que soit la condition nutritionnelle (**Fig. 39 (G)**). Ces résultats signifient que l'infection par l'adénovirus en elle-même n'induit pas de cytolyse accrue du foie des souris. Cependant, la surexpression de Fat10 due à l'infection par l'Ad-FAT10 semble induire les dommages hépatocellulaires à l'origine de cette hausse des transaminases, ce qui pourrait expliquer l'augmentation des FFA circulants observée pour les souris Ad-FAT10 à jeun.



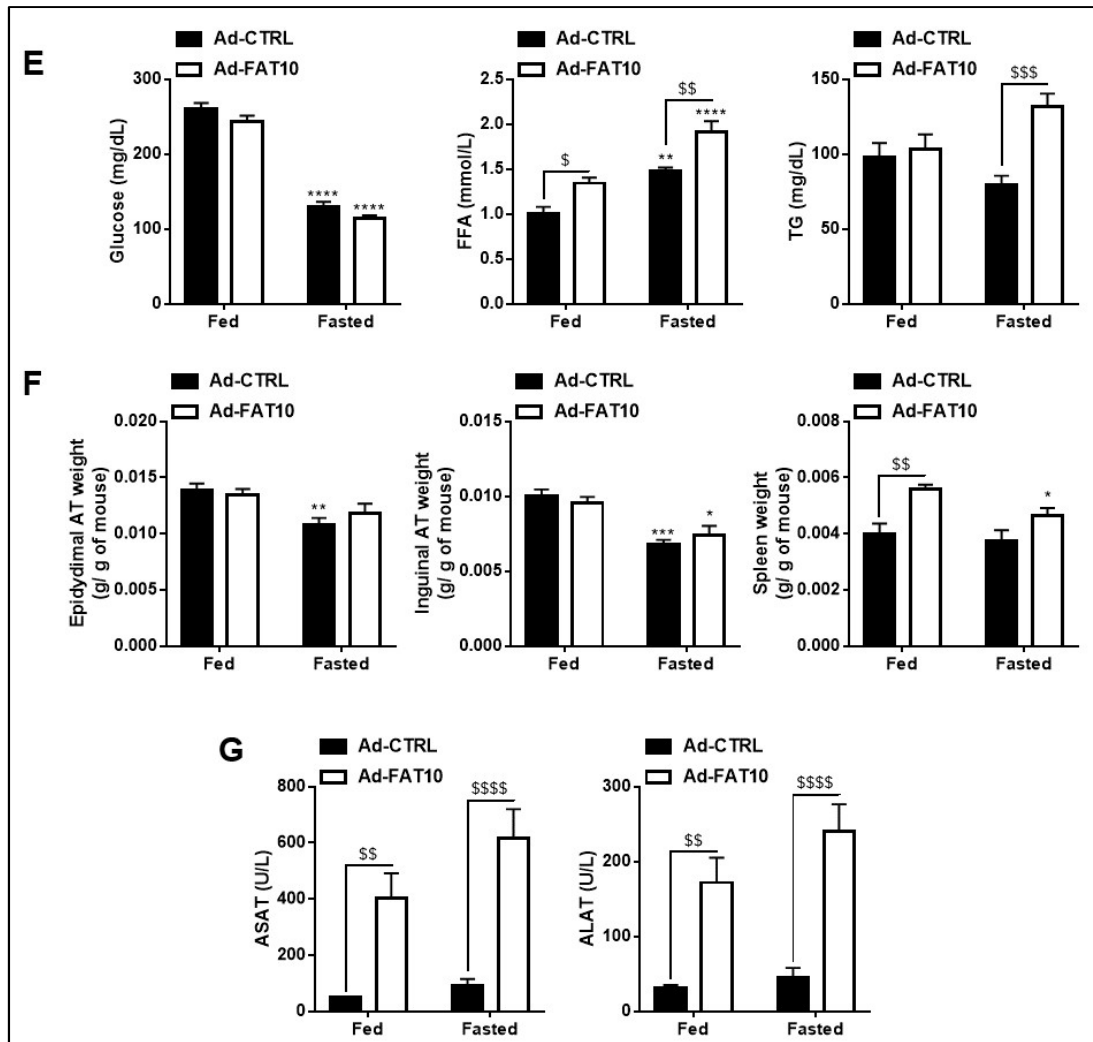


Figure 39 : La surexpression hépatique de *Fat10* induit une modification du phénotype des souris.

Des souris C57Bl6/J ont été infectées avec un adénovirus contrôle (Ad-CTRL) ou induisant la surexpression de *Fat10* (Ad-FAT10) pendant 4 jours. Puis ces souris ont été nourries ad-libitum (« Fed » Ad-CTRL N=10 ; Ad-FAT10 N=9) ou mises à jeun pendant 18h (« Fasted » Ad-CTRL N=10 ; Ad-FAT10 N=10). (A) Mesure du poids des souris au moment du sacrifice. (B) Mesure du poids des foies normalisé par la masse corporelle de chaque souris. (C) Mesure de la concentration hépatique en TG normalisée par le poids des échantillons. (D) Images représentatives du marquage hématoxyline et éosine (H&E) sur des coupes de foie des souris Ad-CTRL et Ad-FAT10 Fed et Fasted. La barre d'échelle représente 100µm. (E) Dosage des concentrations circulantes en glucose, acides gras libres (FFA) et triglycérides (TG). (F) Mesure du poids des tissus adipeux épидидymaux et inguinaux et du poids des rates normalisé par la masse corporelle de chaque souris. (G) Mesure des concentrations plasmatiques en ALAT et ASAT. Moyennes ± SEM. Two-way ANOVA suivie d'un test de Bonferroni. Ad-CTRL vs Ad-FAT10 \$ p<0,05 ; \$\$ p<0,01 ; \$\$\$ p<0,001 ; \$\$\$\$ p<0,0001 ; Fed vs Fasted * p<0,05 ; ** p<0,01 ; *** p<0,001 ; **** p<0,0001.

Afin de vérifier si la surexpression des *Fat10* par l'infection avec l'Ad-FAT10 est restreinte au foie, l'expression de *Fat10* a été mesurée dans d'autres tissus métaboliques et du système immunitaire. De façon surprenante, une légère surexpression de *Fat10* est observée en réponse au jeûne dans les tissus adipeux épидидymal et inguinal. Cet effet est potentialisé lors de l'infection par l'Ad-FAT10 (Fig. 40). Cependant, les niveaux d'expression de *Fat10* observés pour ces tissus sont très inférieurs à ceux observés dans le foie. Dans la rate, où *Fat10* est exprimée constitutivement à l'état

basal, l'expression de *Fat10* est légèrement augmentée pour les souris Ad-FAT10. Cependant, l'induction de l'expression de *Fat10* par l'adénovirus est très inférieure à ce qui est observé dans le foie. Ainsi, ces résultats permettent de justifier que les effets de l'Ad-FAT10 observés sont principalement hépatiques.

Par conséquent, la caractérisation des souris infectées avec l'Ad-FAT10, mise à jeun ou non, a permis de valider la surexpression de *Fat10* dans le foie de ces souris. De plus, elles présentent un foie plus gros ainsi que des concentrations en lipides circulants plus élevées que les souris contrôles ce qui n'est pas associé à une accumulation de lipides hépatiques ni à une lipolyse accrue. Ces résultats suggèrent tout de même que la surexpression de *Fat10* induit une modification du métabolisme des lipides des souris.

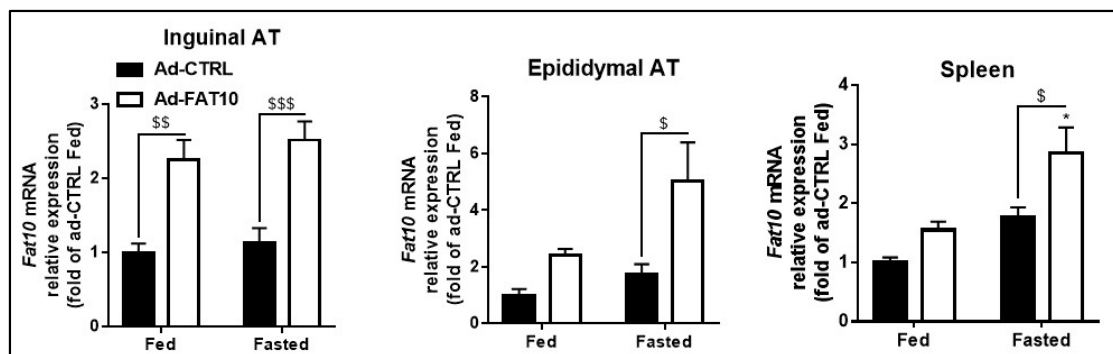


Figure 40 : *Fat10* est faiblement exprimé dans les autres organes que le foie par l'infection avec l'Ad-FAT10.

Des souris C57Bl6/J ont été infectées avec un adénovirus contrôle (Ad-CTRL) ou induisant la surexpression de *Fat10* (Ad-FAT10) pendant 4 jours. Puis ces souris ont été nourries ad-libitum (« Fed » Ad-CTRL N=10 ; Ad-FAT10 N=9) ou mises à jeun pendant 18h (« Fasted » Ad-CTRL N=10 ; Ad-FAT10 N=10). Mesure de l'expression ARNm de *Fat10* dans les tissus adipeux épidydimaux, inguinaux et la rate des souris Fed et Fasted infectées avec l'adénovirus contrôle et l'adénovirus *Fat10*. Les résultats exprimés par rapport à l'expression dans les foies des souris Ad-CTRL Fed à laquelle a été attribuée la valeur 1. Moyennes \pm SEM. Two-way ANOVA suivie d'un test de Bonferroni. Ad-CTRL vs Ad-FAT10 \$ $p < 0,05$; \$\$\$ $p < 0,001$. Fed vs Fasted * $p < 0,05$.

ii. La surexpression de *Fat10* induit une interaction de *Fat10* avec *Ppara* et inhibe l'activité de *Ppara* en réponse à un jeûne long

Afin de caractériser l'expression et l'activité de *Ppara* *in vivo* lors de la surexpression de *Fat10*, les expressions de *Ppara* et de certains de ses gènes cibles ont été mesurées par RT qPCR dans les foies des souris infectées avec l'Ad-CTRL et l'Ad-FAT10 nourries ou mises à jeun. Comme attendu, la période de jeûne de 18 heures induit une augmentation de 2 fois l'expression de *Ppara* dans les foies des souris Ad-CTRL (**Fig. 41 (A)**). Cependant, cette augmentation est significativement moins élevée dans les foies de souris infectées avec l'Ad-FAT10 (seulement 1,5 fois) et une corrélation négative est observée entre l'expression de *Fat10* et celle de *Ppara* dans les foies des souris soumises à un jeûne de 18 heures (**Fig.**

41 (B)). Il est intéressant de noter que l'expression de *Ppara* n'est pas impactée par l'infection à l'Ad-FAT10 chez les souris nourries *ad-libitum*.

De même, l'expression des gènes cibles de *Ppara*, tels que *Hmgcs2*, *Cpt1α* ou *Aco*, est augmentée respectivement de 4, 6 ou 2,5 fois par le jeûne dans les foies des souris contrôles. Cependant, cette augmentation est réprimée dans le foie des souris infectées avec l'Ad-FAT10 et l'augmentation de l'expression d'*Hmgcs2* observée n'est plus que de 3 fois, de 4 fois pour *Cpt1α* et de 1,5 fois pour *Aco* (**Fig. 41 (C)**). Comme constaté pour l'expression de *Ppara*, la modulation de l'expression de ses gènes cibles par l'infection avec l'Ad-FAT10 n'est observée qu'en réponse au jeûne. Ainsi, la corrélation entre l'expression de *Fat10* et celle de certains gènes cibles de *Ppara* a été établie. La corrélation mise en évidence entre l'expression de *Fat10* et de ces gènes, impliqués dans différentes voies du métabolisme des lipides, est négative (**Fig. 41 (D)**). Ces observations suggèrent alors que la surexpression de *Fat10* dans les foies des souris altère l'activité transcriptionnelle de *Ppara* induite par le jeûne.

Enfin, pour vérifier si les effets de la surexpression de *Fat10* observés précédemment sur l'activité de *Ppara* sont associés à une interaction entre les deux protéines, un marquage PLA en immunohistochimie des interactions *Fat10/Ppara* a été effectué sur des coupes de foies des souris infectées avec l'Ad-FAT10 et l'Ad-CTRL mise à jeun pendant 18 heures. L'observation des coupes ainsi marquées a permis de détecter des interactions *Fat10/Ppara* dans les foies des souris infectées avec l'Ad-FAT10 seulement (**Fig. 41 (E)**). De plus, les interactions semblent majoritairement localisées dans les noyaux des cellules ce qui indique que l'infection par l'Ad-FAT10 favorise l'interaction de *Fat10* avec *Ppara*.

Ainsi, l'ensemble de ces observations démontre que la surexpression de *Fat10* induit une interaction de *Fat10* avec *Ppara* qui est associée à une inhibition de l'activité transcriptionnelle de *Ppara* induite par le jeûne dans le foie *in vivo*. Ces résultats permettent donc de mieux comprendre le mécanisme d'action de *Fat10* sur *Ppara* *in vivo*. *Fat10* étant surexprimée dans les hépatocytes lors du développement de la NASH, et interagissant avec *Ppara*, ces résultats suggèrent qu'un mécanisme similaire à ce qui est mis en évidence dans les foies des souris Ad-FAT10 se produit lors de la progression de la maladie.

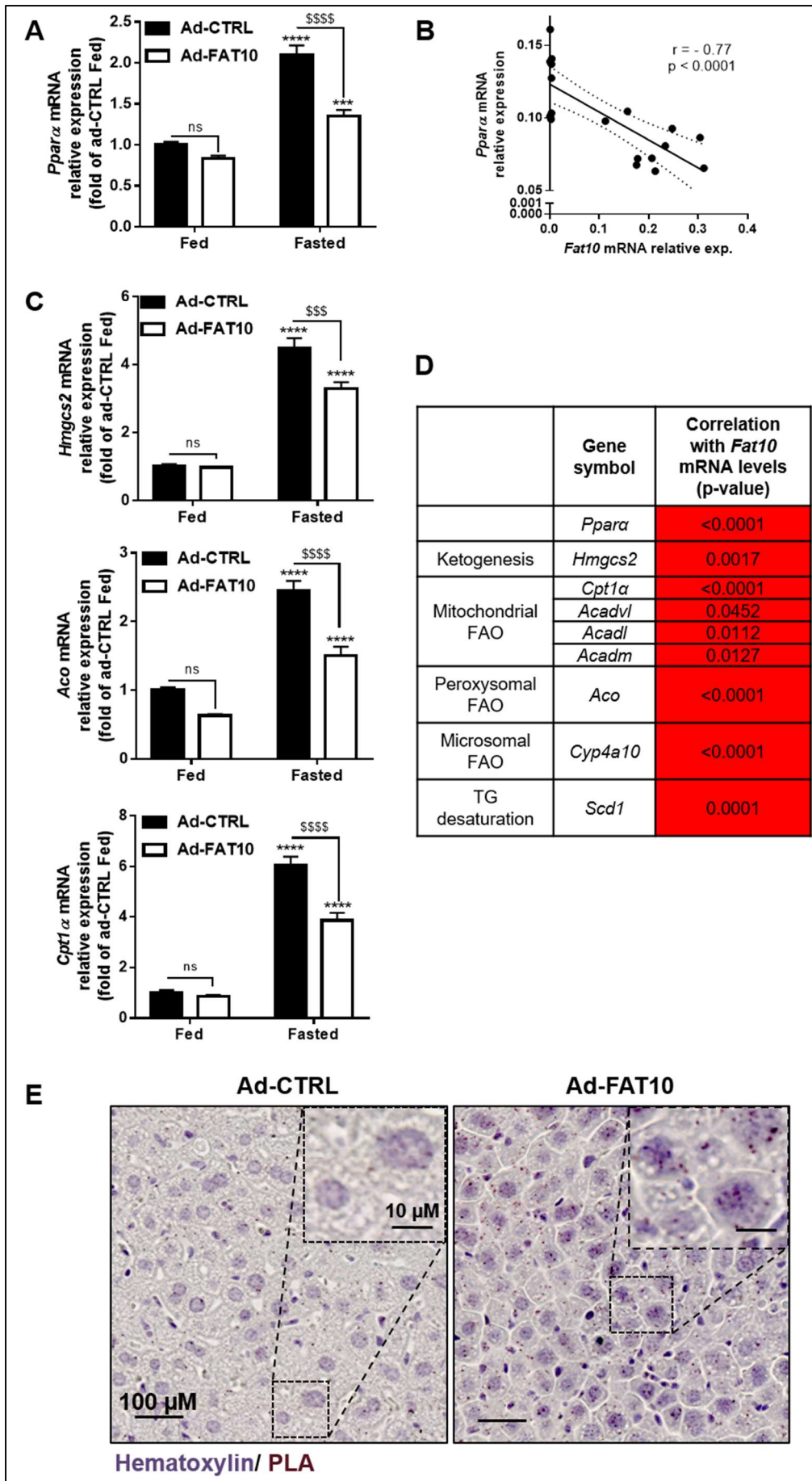


Figure 41 : La surexpression de FAT10 *in vivo* réprime l'activité transcriptionnelle de Ppara en réponse au jeûne et conduit à une interaction entre Fat10 et Ppara.

Des souris C57Bl6/J ont été infectées avec un adénovirus contrôle (Ad-CTRL) ou induisant la surexpression de Fat10 (Ad-FAT10) pendant 4 jours. Puis ces souris ont été nourries ad-libitum (« Fed » Ad-CTRL N=10 ; Ad-FAT10 N=9) ou mises à jeun pendant 18h (« Fasted » Ad-CTRL N=10 ; Ad-FAT10 N=10). **(A)** Mesure de l'expression ARNm de *Ppara* dans le foie total des souris Fed et Fasted infectées avec l'adénovirus contrôle et l'adénovirus Fat10. Les résultats exprimés par rapport à l'expression dans les foies des souris Ad-CTRL Fed à laquelle a été attribuée la valeur 1. **(B)** Corrélation entre l'expression de *Fat10* et celle de *Ppara* déterminées par RT qPCR dans le foie total des souris fasted Ad-CTRL et Ad-FAT10. La corrélation est une régression linéaire dont la droite est représentée avec un intervalle de confiance à 95% (lignes pointillées). Le coefficient de corrélation, *r*, et la *p*-value, *p* sont indiqués. **(C)** Mesure des expressions ARNm de certains gènes cibles de *Ppara*, *Hmgcs2*, *Aco* et *Cpt1a* dans le foie total des souris Fed et Fasted infectées avec l'adénovirus contrôle et l'adénovirus Fat10. Les résultats exprimés par rapport à l'expression dans les foies des souris Ad-CTRL Fed à laquelle a été attribuée la valeur 1. **(D)** Corrélation entre l'expression de *Fat10* et celle de certains gènes cible de *Ppara* déterminées par RT qPCR dans le foie total des souris fasted Ad-CTRL et Ad-FAT10. Les corrélations sont des régressions linéaires. Le coefficient de corrélation, *r*, et la *p*-value, *p* sont indiqués. **(E)** Images représentatives de l'immunomarquage des interactions entre FAT10 et PPAR α sur des coupes de foie de souris fasted Ad-CTRL (N=5) et Ad-FAT10 (N=5). Les noyaux sont marqués en bleu (hématoxiline) et le marquage pour les interactions FAT10/PPAR α est obtenu par un kit de Proximity Ligation Assay (PLA) en rouge. La barre d'échelle représente 100 μ m. En haut à gauche de chaque image, un zoom sur les cellules représentatives des cellules de la coupe est réalisé et la barre d'échelle représente 10 μ m. Moyennes \pm SEM. Two-way ANOVA suivie d'un test de Bonferroni. Ad-CTRL vs Ad-FAT10 ns non-significatif ; \$\$\$ $p < 0,001$; \$\$\$\$ $p < 0,0001$; Fed vs Fasted **** $p < 0,0001$.

f. FAT10 altère la réponse de PPAR α à l'agoniste

i. La diminution de l'expression de FAT10 améliore la réponse de PPAR α à son agoniste *in vitro*

Dans les cellules HepG2 traitées avec des cytokines pro-inflammatoires, une augmentation de l'activité transcriptionnelle de PPAR α a été observée précédemment lors de l'inhibition de l'expression de *FAT10*. Ainsi, la question de l'impact de l'ubiquitin-like sur la réponse de PPAR α à son agoniste s'est posée. Pour y répondre, des cellules HepG2 préalablement transfectées avec le siFAT10 ont été traitées avec 1 μ M de pémafibrate, un agoniste sélectif de PPAR α , puis l'expression de *Fat10*, *PPAR α* et de ses gènes cibles a été mesurée. Tout d'abord, l'expression de *Fat10* est bien diminuée par le siFAT10 et n'est pas modulée par le traitement au pémafibrate (**Fig. 42 (A)**). De plus, le traitement au pémafibrate n'a pas d'impact sur l'expression de *PPAR α* . Par contre, il augmente d'environ 10 fois l'expression de certains de ses gènes cibles tels qu'*HMGCS2* et *PK4* dans les HepG2 transfectées avec le siCTRL. De façon intéressante, cette induction en réponse à l'agoniste est plus élevée pour les HepG2 transfectées avec le siFAT10 qu'avec le siCTRL. En effet, l'induction de l'expression des deux gènes cibles est près de 5 fois supérieure dans les cellules traitées au pémafibrate lors de la diminution de l'expression de *FAT10* (**Fig. 42 (B)**). Ces résultats témoignent d'une meilleure activité transcriptionnelle de PPAR α en réponse au pémafibrate lorsque l'expression de *FAT10* est inhibée.

Pour valider ces résultats, les cellules surexprimant stablement *FAT10* ont été traitées avec 100 nM de pémafibrate. Comme précédemment, dans les cellules HepG2-CTRL, le traitement au

pémafibrate n'a pas d'impact sur l'expression de *PPARα* ni sur celle de *FAT10*, mais il induit l'expression de certains des gènes cibles de *PPARα*, comme *HMGCS2* et *PDK4*, dont les expressions sont augmentées de 2,5 fois, et de 3,5 fois respectivement. Cependant, dans les cellules HepG2-FAT10 l'induction de l'expression d'*HMGCS2* est diminuée. L'expression de *PDK4* n'est pas significativement réduite par la surexpression de *FAT10* mais, son expression tend à être moins induite en réponse au pémafibrate (**Fig. 42 (C)**). Ainsi, la surexpression stable de *FAT10* semble réprimer l'activité transcriptionnelle de *PPARα* en réponse au pémafibrate ce qui valide les résultats obtenus précédemment.

L'ensemble de ces observations démontre donc que la modulation de l'expression de *FAT10 in vitro* régule l'activité transcriptionnelle de *PPARα* en réponse à un agoniste synthétique.

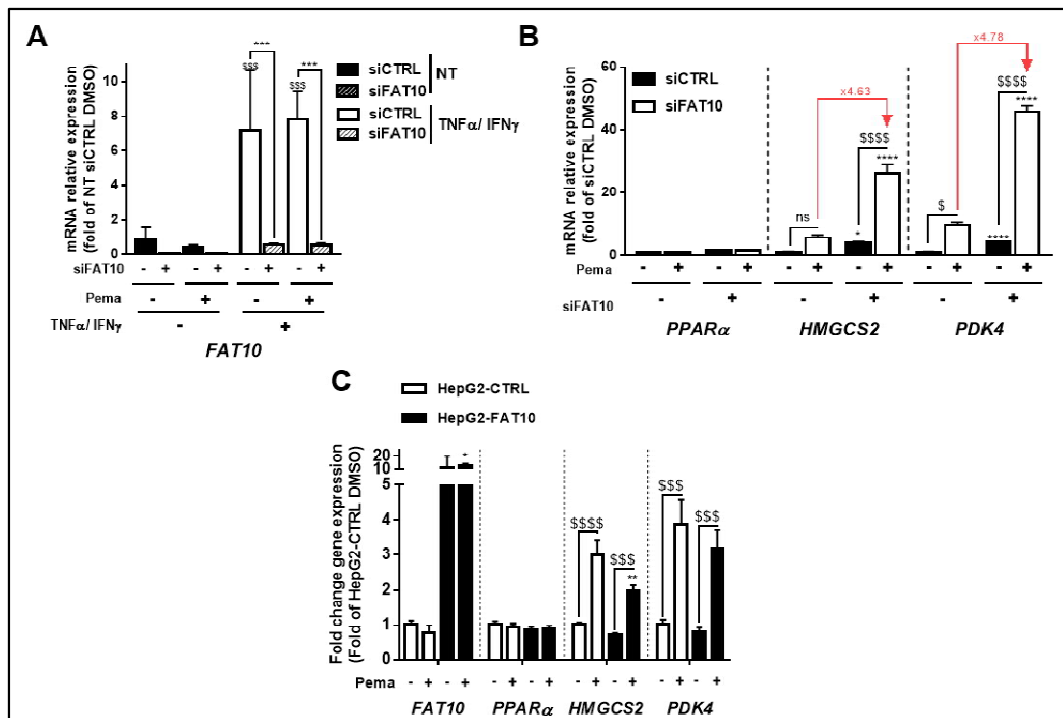


Figure 42 : La modulation de *FAT10 in vitro* régule l'activité transcriptionnelle de *Pparα* en réponse au pémafibrate.

(A) Les cellules HepG2 ont été transfectées avec un siARN contrôle (siCTRL) ou un siARN ciblant FAT10 (siFAT10) pendant 24 heures puis ces cellules sont traitées ou non avec avec TNF α /IFN γ (50ng/mL / 10 ng/mL) dans un milieu sans sérum pendant 24 heures puis traitées ou non (DMSO) avec du pémafibrate (Péma, 1 μ M) pendant 18 heures. Mesure de l'expression ARNm de *FAT10*. Les résultats exprimés par rapport à l'expression dans les cellules HepG2 non-traitées et mise en présence de DMSO à laquelle a été attribuée la valeur 1. Moyenne \pm SD. Two-way ANOVA suivie d'un test de Bonferroni siCTRL vs siFAT10 \$\$\$ p<0,001. **(B)** Les cellules HepG2 transfectées avec le siCTRL ou le siFAT10 pendant 24 heures ont été traitées avec TNF α /IFN γ (50ng/mL / 10 ng/mL) dans un milieu sans sérum pendant 24 heures puis traitées ou non (DMSO) avec du pémafibrate (1 μ M) pendant 18 heures. Mesure des expressions de *PPAR α* , *HMGCS2* et *PDK4*, deux gènes cibles de PPAR α . Les résultats sont exprimés par rapport à l'expression dans les cellules HepG2 non-traitées à laquelle a été attribuée la valeur 1. Les flèches rouges indiquent le facteur multiplicatif entre la condition siCTRL et siFAT10 pour les cellules traitées au pémafibrate. Moyenne \pm SD. Two-way ANOVA suivie d'un test de Bonferroni siCTRL vs siFAT10 * p<0,05 ; **** p<0,0001 ; DMSO vs Péma ns non-significatif ; \$ p<0,05 ; \$\$\$ p<0,0001. **(C)** Mesure des expressions ARNm de *FAT10*, *PPAR α* , *HMGCS2* et *PDK4*, dans les cellules HepG2-FAT10 et HepG2-CTRL cultivées dans un milieu sans sérum pendant 24 heures puis traitées ou non (DMSO) avec du pémafibrate (Péma, 100nM) pendant 18 heures. Les résultats sont exprimés par rapport à l'expression dans les cellules HepG2-CTRL DMSO à laquelle a été attribuée la valeur 1. Moyenne \pm SD. Two-way ANOVA suivie d'un test de Bonferroni HepG2-CTRL vs HepG2-FAT10 * p<0,05 ; ** p<0,01 ; DMSO vs Péma \$\$\$ p<0,001 ; \$\$\$ p<0,0001.

ii. La surexpression de *Fat10* bloque la réponse de *Ppara* à son agoniste *in vivo*

Afin d'évaluer l'impact de la surexpression de *Fat10* sur la réponse de *Ppara* à son agoniste *in vivo*, les souris infectées avec l'Ad-FAT10 ou l'Ad-CTRL ont été traitées oralement avec 1 mg/kg de pémafibrate le soir du 4^{ème} jour et le matin du 5^{ème} jour après l'infection. Ces souris ont ensuite été mises à jeun pendant 5 heures puis mises à mort afin de récupérer leur foie. Les expressions de *Fat10*, de *Ppara* et de ses gènes cibles ont été mesurées par RT qPCR dans le foie de ces souris. Ainsi, l'expression de *Fat10* est bien augmentée par l'infection avec l'Ad-FAT10 et n'est pas modulée par le traitement au pémafibrate (**Fig. 43 (A)**). De façon intéressante, l'expression de *Ppara* est diminuée dans les foies des souris infectées avec l'Ad-FAT10 à l'état basal après 5 heures de jeûne et le traitement au pémafibrate n'a pas d'effet sur l'expression de *Ppara*. Par contre, le traitement au pémafibrate induit fortement l'expression de certains gènes cibles de *Ppara* comme *Aco* ou *Cyp4a14*, dont les expressions augmentent respectivement de 100 et de 30 fois dans les foies de souris infectées avec l'Ad-CTRL. Dans les foies des souris surexprimant *Fat10*, l'expression des gènes cibles de *Ppara* est également augmentée en réponse à l'agoniste mais dans une moindre mesure par rapport aux souris infectées avec l'Ad-CTRL. Les expressions d'*Aco* ou de *Cyp4a14* ne sont alors augmentées que de 50 et de 13 fois dans les foies de souris infectées avec l'Ad-FAT10. Ces observations démontrent que l'activité transcriptionnelle de *Ppara* en réponse à son agoniste est réduite dans les foies de souris surexprimant *Fat10* (**Fig. 43 (B)**).

L'ensemble de ces résultats montre que la surexpression de Fat10 dans le foie de souris réprime l'activité transcriptionnelle de Ppar α en réponse à son agoniste. Il est probable que ce mécanisme se produise lors du développement de la NASH où une surexpression de Fat10 est observée. Par conséquent, la surexpression de Fat10 est susceptible de diminuer l'efficacité des agonistes de Ppar α dans un contexte de NASH.

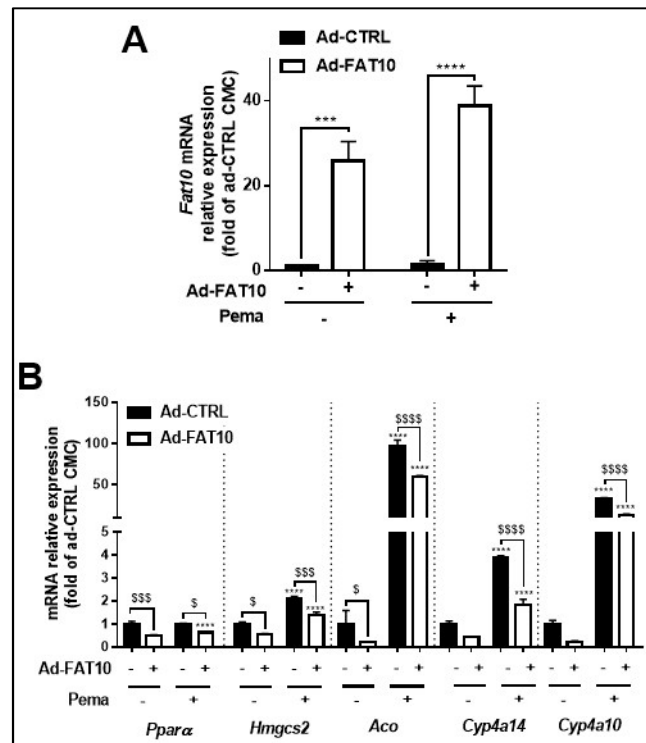


Figure 43 : La surexpression de FAT10 *in vivo* réprime l'activité transcriptionnelle de Ppar α en réponse au pémafibrate.

Des souris C57Bl6/J ont été infectées avec un adénovirus contrôle (Ad-CTRL) ou induisant la surexpression de Fat10 (Ad-FAT10) pendant 4 jours. Puis ces souris ont été traitées oralement avec le pémafibrate (1mpk, Ad-CTRL N=6 ; Ad-FAT10 N=5) ou non (Ad-CTRL N=5 ; Ad-FAT10 N=6). 18h après, le traitement a été répété. Mesure de l'expression ARNm de (A) *Fat10*, (B) de *Ppar α* et de certains de ses gènes cibles, *Hmgcs2*, *Aco*, *Cyp4a14* et *Cyp4a10* dans le foie total des souris. Les résultats exprimés par rapport à l'expression dans les foies des souris Ad-CTRL non-traitées au pémafibrate à laquelle a été attribuée la valeur 1. Moyennes \pm SEM. Two-way ANOVA suivie d'un test de Bonferroni. Ad-CTRL vs Ad-FAT10 \$ p<0,05 ; \$\$\$ p<0,001 ; \$\$\$\$ p<0,0001 ; Fed vs Fasted *** p<0,001 ; **** p<0,0001.

Partie 5 : Discussion

1) L'expression de *FAT10* est augmentée spécifiquement dans les hépatocytes lors du développement de la NASH

L'étude menée lors de cette thèse avait pour objectif de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la régulation de PPAR α lors de la progression de la NASH. Dans ce but, l'analyse de données transcriptomiques issues de foies de patients atteints de NASH a été menée et a permis d'identifier *FAT10*, un gène codant pour une protéine de la famille des ubiquitin-like (W. Fan *et al.*, 1996), comme étant surexprimée dans le foie des patients malades. Cette observation est en accord avec les données de la littérature démontrant une surexpression de *FAT10* dans le foie de patients présentant une inflammation chronique du foie associée à la NASH (Jia *et al.*, 2018; Dali-Youcef *et al.*, 2019; Vandel, Dubois-Chevalier, *et al.*, 2020). L'expression de *FAT10* est aussi démontrée comme élevée dans le foie de patients atteints de stéatohépatite alcoolique (ASH) (Jia *et al.*, 2018) ou d'HCC (Zhang *et al.*, 2021). Ces deux pathologies sont également associées à une inflammation hépatique ce qui suggère que la surexpression de *FAT10* n'est pas spécifique de la NASH. De plus, l'analyse transcriptomique des foies humains nous a permis d'observer une corrélation positive entre l'expression de *FAT10* et la sévérité de la maladie mais aussi l'expression de gènes pro-inflammatoires associés à la sévérité de la maladie comme cela a déjà pu être publié pour d'autres études de cohortes (Dali-Youcef *et al.*, 2019). Ces observations sont cohérentes puisque l'expression de *FAT10* est connue pour être induite dans plusieurs lignées cellulaires, dont des hépatocytes cancéreux, par des stimuli pro-inflammatoires (Choi, Kim and Yoo, 2014b; Schregle *et al.*, 2018). Cependant, nous observons au sein de l'équipe que le traitement de la lignée HepG2 avec de l'acide palmitique (500 μ M pendant 9, 12 ou 24 heures) n'induit pas de surexpression de *FAT10* (données non-montrées), contrairement aux cytokines pro-inflammatoires. Ces résultats suggèrent que l'exposition des hépatocytes à des acides gras saturés ne suffit pas à induire l'expression de *FAT10* et que le stimulus pro-inflammatoire est nécessaire à la surexpression de l'ubiquitin-like. Ces résultats indiquent donc que la surexpression de *FAT10* observée dans les foies humains lors du développement de la NASH est spécifique du contexte inflammatoire se mettant en place dans le parenchyme hépatique lors du développement de la maladie.

Nous avons ensuite démontré que cette surexpression de *Fat10* est aussi observée dans les foies de plusieurs modèles murins pré-cliniques de NASH induite par un régime. Ce résultat est novateur, puisqu'auparavant, la surexpression de *Fat10* n'a été observée que dans le modèle de souris nourries

avec le DDC (Hui Liu *et al.*, 2014). Or, comme mentionné dans l'introduction, FAT10 est constitutivement exprimé dans les cellules dendritiques ou les cellules NKT et son expression peut être induite par des stimuli pro-inflammatoires dans les lymphocytes B ou les monocytes (Schregle *et al.*, 2018). Ces cellules immunes infiltrent le foie lors du développement de la NASH, participent au développement de la maladie (Cai, Zhang and Li, 2019) et pourraient être responsables de l'augmentation de l'expression de *FAT10* observée lors de la progression de la maladie chez l'humain et la souris. PPAR α étant principalement exprimé dans les hépatocytes (Berthier *et al.*, 2021), nous avons concentré notre étude sur ce type cellulaire et nous avons isolé les hépatocytes issus des foies de souris nourries avec le CDAA pendant 2 semaines afin d'y évaluer l'expression de *Fat10*. La surexpression de *Fat10* spécifiquement dans les hépatocytes des souris atteintes de NASH suggère donc que FAT10 ne joue pas un rôle dans les cellules immunes lors de la progression de la NASH mais qu'il joue plutôt un rôle dans les hépatocytes.

La surexpression de FAT10 a ensuite été validée à l'échelle protéique par des marquages immunofluorescents de la protéine. L'observation de ces marquages nous a permis de localiser FAT10 avec un marquage diffus dans le cytoplasme et dans le noyau, où la protéine semble plus exprimée, au sein des hépatocytes sur les coupes de foies humains atteints de NASH. Cette observation est confirmée dans les HepG2 traitées aux cytokines ou surexprimant stablement FAT10 (HepG2-FAT10, données non montrées) pour lesquelles le marquage est aussi diffus et plus intense dans les noyaux. Le marquage de FAT10 sur des coupes de foie de patients atteints d'ASH et de NASH par Jia *et al.* révèle également une expression diffuse de FAT10 dans les hépatocytes mais aucune différence d'expression de FAT10 n'est observée entre les différents compartiments cellulaires (Jia *et al.*, 2018). Cependant, la résolution des images présentées dans cet article est faible et les noyaux ne sont pas marqués spécifiquement ce qui ne facilite pas la distinction des compartiments cellulaires.

Dans les foies des souris nourries avec un CDAA de 2 semaines et des souris infectées avec l'Ad-FAT10, le marquage immunofluorescent spécifique de *Fat10* est également diffus mais semble plus intense dans le cytoplasme que dans les noyaux des hépatocytes. Cette différence avec les coupes humaines est difficile à expliquer car les mécanismes de transport de FAT10 entre le cytoplasme et le noyau sont peu connus. De plus, les souris Ad-FAT10 présentent aussi un marquage intense au niveau de structures ressemblant à des agrégats protéiques dans les cellules. De façon intéressante, il a été démontré qu'un traitement au DDC pendant 10 semaines induit une relocalisation de *Fat10* dans des structures d'agrégats protéiques (Oliva *et al.*, 2010). Nous observons la formation d'agrégats similaires, marqués positivement pour FAT10 dans les cellules HepG2 traitées avec de l'acide palmitique (Cho *et al.*, 2018).

Ces résultats suggèrent donc que l'expression hépatique de la protéine FAT10 est augmentée au cours de la progression de la NASH et semble être différemment localisée dans les hépatocytes humains et murins. De plus, un stress aigu, tel que l'infection par un adénovirus ou un traitement à l'acide palmitique, favorise la relocalisation de FAT10 dans des agrégats protéiques semblables à des MDB. Il serait intéressant de prolonger l'exposition des souris au régime CDAA jusqu'à l'apparition de MDB pour vérifier si ce stimulus, induisant une inflammation chronique lorsqu'il est prolongé, induit aussi la relocalisation de Fat10 dans les agrégats.

2) Étude de la régulation de PPAR α dans le contexte pathologique de la NASH

L'étude des données transcriptomiques issues des foies des patients atteints de NASH a également permis de voir que l'expression de *FAT10* est négativement corrélée à l'expression de *PPAR α* et à celle de certains de ses gènes cibles. Ces corrélations ont aussi été observées dans les hépatocytes des souris nourries avec le CDAA pendant 2 semaines ce qui suggère une régulation de l'expression et de l'activité de PPAR α par FAT10 lors de la progression de la NASH chez l'humain et chez la souris. Or, comme mentionné dans l'introduction de ce manuscrit, l'expression et l'activité de PPAR α sont finement régulées par plusieurs stimuli comme le statut nutritionnel notamment (Berthier *et al.*, 2021). Cette régulation peut se produire, à l'échelle moléculaire, par des modifications post-traductionnelles allant de la phosphorylation (Blanquart *et al.*, 2004; Hinds *et al.*, 2017; Brunmeir and Xu, 2018) à l'ubiquitylation (Blanquart *et al.*, 2002; Z. Zhao *et al.*, 2018) en passant par la SUMOylation (Leuenberger, Pradervand and Wahli, 2009; Pourcet *et al.*, 2010). Cependant, toutes ces voies de régulation ont été identifiées dans des conditions physiologiques. Lors de la progression de la NASH, la diminution de l'expression et de l'activité de PPAR α a été observée (Francque *et al.*, 2015) mais les mécanismes à l'origine de cette régulation sont peu connus. Une étude récente s'est placée dans des conditions de NASH ce qui a permis à Du M et al d'identifier la protéine NFATC4 comme un régulateur négatif de l'activité de PPAR α . En effet, les auteurs démontrent que Nfatc4 devient active en transloquant dans le noyau des hépatocytes de souris spécifiquement lors du développement de la NASH pour interagir avec Ppar α . L'interaction entre Ppar α et Nfatc4 conduit à une inhibition de l'activité transcriptionnelle de Ppar α qui se traduit par une diminution de l'expression de ses gènes cibles et un développement plus sévère de la stéatose (Du *et al.*, 2020). Cette étude démontre donc que l'activité de PPAR α est régulée différemment en condition pathologique puisque c'est seulement dans ces circonstances que de nouveaux acteurs, tels que NFATc4 ou FAT10, deviennent fonctionnels dans les hépatocytes. Ainsi, la corrélation négative entre les expressions de *FAT10* et de *PPAR α* indique un rôle pour FAT10 dans la régulation de l'activité de PPAR α au cours du développement de la NASH.

3) Mode d'action de FAT10 sur la régulation de l'activité de PPAR α

FAT10 interagit avec ses partenaires notamment pour induire la dégradation de ces derniers via la voie du protéasome comme démontré pour p62 (Aichem *et al.*, 2012) ou PCNA (Chen, W. Zhang, *et al.*, 2018). Ainsi, l'étude de la relation entre FAT10 et PPAR α nous a permis d'identifier une interaction covalente entre les deux protéines ce qui démontre une nouvelle modification post-traductionnelle de PPAR α dans un contexte de NASH. D'après nos résultats de co-immunoprécipitation, réalisée en conditions dénaturantes, cette interaction est covalente ce qui suggère que la fixation de FAT10 sur PPAR α fait intervenir les ligases impliquées dans la FATylation, UBA6 et USE1 (Aichem *et al.*, 2010; Bialas, Groettrup and Aichem, 2015). De plus, cette interaction fait certainement intervenir le domaine di-glycine de FAT10 puisque l'ubiquitin-like interagit covalamment avec ses partenaires via ce domaine (Schmidtke, Aichem and Groettrup, 2014). Au niveau de PPAR α , l'identification du site d'interaction avec FAT10 nécessite de nouvelles expériences. Cependant, les sites de fixation de SUMO, une autre protéine de la famille des ubiquitin-like, ont pu être mis en évidence sur les lysines 358, présentes sur domaine de liaison au ligand (LBD, domaine E), ou les lysines 185, présentes sur la région charnière (domaine D) de PPAR α (Leuenberger, Pradervand and Wahli, 2009; Pourcet *et al.*, 2010). De façon intéressante il est démontré que FAT10 entre en compétition avec SUMO notamment pour interagir avec JunB. En effet, Aichem *et al.* démontrent que la SUMOylation de JunB est réduite lors de la surexpression de FAT10 (Aichem, Sailer, *et al.*, 2019). On peut donc imaginer une fixation des deux ubiquitin-like sur les mêmes résidus et il serait intéressant de muter les lysines 185 et 358 sur PPAR α afin de vérifier si l'interaction de ces mutants avec FAT10 se produit ou non. De plus, des expériences de spectrométries de masse sont envisagées dans le but d'identifier d'éventuels cofacteurs participant à la dégradation des complexes FAT10/PPAR α et/ ou à la régulation de l'activité de PPAR α mais aussi pour identifier précisément les domaines d'interaction entre les deux protéines. Ces expériences permettront également de savoir si la fixation de FAT10 sur PPAR α altère la capacité du récepteur nucléaire à se fixer sur ses éléments de réponse sur l'ADN de ses gènes cibles. En effet, si FAT10 se fixe au niveau du DBD ou à son voisinage, il est possible qu'il empêche la bonne fixation de PPAR α sur les PPRE de ses gènes cibles. Un tel mécanisme expliquerait la diminution de l'activité transcriptionnelle de PPAR α lorsque FAT10 est surexprimée.

De façon surprenante, nos résultats montrent que cette interaction n'est pas associée à une diminution de l'expression protéique de PPAR α lors de la surexpression stable de FAT10 ce qui semble exclure l'hypothèse d'une dégradation accrue de PPAR α dans ces conditions. Par contre, nous observons une accumulation des complexes FAT10/PPAR α lors de l'inhibition des voies de dégradation protéasomale et lysosomale ce qui suggère une implication de la dégradation protéique dans le devenir des complexes FAT10/PPAR α . Il est démontré que FAT10 est également capable d'interférer

avec la fixation des autres ubiquitin-like ou même la fixation de l'ubiquitine afin de stabiliser ses partenaires, tels que β -catenin (Yuan *et al.*, 2014) ou eEF1A1 (Liu *et al.*, 2016). Nos résultats montrent que l'expression protéique de PPAR α n'est pas augmentée lors de la surexpression de FAT10, l'hypothèse d'une stabilisation de PPAR α par FAT10 semble être aussi exclue. Il est aussi important de noter que la demi-vie de PPAR α est très rapide, environ 1 heure en absence de ligand (Blanquart *et al.*, 2002), et celle de FAT10 dure environ 2 heures (Raasi, Schmidtke and Groettrup, 2001). Cette fugacité des deux protéines complique l'étude de la régulation de leurs expressions protéiques et des mécanismes impliqués dans leur dégradation. Des expériences en conditions d'inhibition de la synthèse protéique sont notamment à envisager pour aller plus loin dans la compréhension du mécanisme de régulation de PPAR α par FAT10.

FAT10 est aussi capable de réprimer l'activité de ses partenaires sans moduler leur dégradation. L'interaction de FAT10 avec le facteur de transcription p53, par exemple, inhibe l'activité de p53 en modifiant sa conformation (Li *et al.*, 2011). De plus, l'interaction de FAT10 avec RIG-I provoque son inhibition en séquestrant la protéine dans des agrégats protéiques (Nguyen *et al.*, 2016). Ces mécanismes sont intéressants à prendre en compte dans le cadre de notre étude puisqu'il est connu que lors du développement de la NASH, des agrégats protéiques se forment dans les hépatocytes. Ces agrégats, les MDB, sont fortement associés à la sévérité de la maladie (Fukushima *et al.*, 2018; Nikam *et al.*, 2018) et se forment dans ce contexte à la suite de l'inhibition des voies de dégradation protéique (Cho *et al.*, 2018). De plus, les souris déficientes pour *Fat10* traitées avec du DDC ne sont pas capable de développer des MDB ce qui indique que l'ubiquitin-like est nécessaire au processus de formation de ces agrégats (French *et al.*, 2012). Il est intéressant d'observer que les interactions FAT10/PPAR α s'accumulent lors de l'inhibition des voies de dégradation protéique et ont tendance à s'agréger. Il serait donc intéressant de mieux caractériser la localisation des complexes FAT10/PPAR α dans nos modèles de NASH *in vivo*, mais aussi dans un modèle de MDB *in vitro*. L'équipe est actuellement en train de développer un modèle d'hépatocytes traités au palmitate induisant la formation d'agrégats dans lesquels les interactions FAT10/PPAR α vont être caractérisées.

De façon intéressante, *in vivo*, les interactions FAT10/PPAR α détectées dans les foies des souris infectées avec l'Ad-FAT10 sont visuellement moins nombreuses que dans les foies des souris nourries avec le régime CDAA. Ce phénomène est peut-être dû au fait que les voies de dégradation, responsables de la dégradation de Fat10 et des protéines FATylées, sont inhibées lors du développement de la NASH. En effet, les acides gras saturés inhibent la voie de l'autophagie en bloquant la fusion du lysosome avec l'autophagosome (Park *et al.*, 2014). De plus, l'inflammation, observée dans le foie des souris atteintes de NASH, favorise la conversion du 26S protéasome en 20S protéasome (immunoprotéasome) qui présente une activité de dégradation inhibée (French *et al.*, 2011). Ici, les souris infectées avec les adénovirus ne sont pas soumises à de telles conditions

d'inhibition des voies de dégradation et, au contraire, le jeûne a pour effet d'induire l'autophagie (Chaudhary *et al.*, 2022). Ainsi, les protéines FATylées, dont Ppar α , sont susceptibles d'avoir un renouvellement plus rapide dans les foies de ces souris par rapport à des souris atteintes de NASH, les rendant plus difficile à détecter *in situ*.

Enfin, les travaux présentés précédemment montrent également que l'interaction identifiée entre FAT10 et PPAR α est associée à une inhibition de l'activité de PPAR α *in vivo* et *in vitro*. De plus, une diminution de l'expression génique de PPAR α et de ses gènes cibles est observée dans les conditions où l'on observe cette interaction. Cependant, la diminution de l'expression protéique de PPAR α n'est pas observée lorsque FAT10 est surexprimée. Au contraire, la diminution de l'expression de FAT10 *in vitro* favorise l'expression génique de PPAR α alors que son expression protéique est inchangée. Ainsi, la modification post-traductionnelle de PPAR α se répercute sur sa propre expression génique. Or, PPAR α est son propre gène cible. En effet, sur le promoteur de PPAR α se trouve un élément de réponse à HNF4 qui est un facteur de transcription clé dans la régulation du métabolisme des lipides dans les hépatocytes. Cet élément de réponse de HNF4 se comporte comme un élément de réponse de PPAR α sur lequel se fixe les hétérodimères PPAR α /RXR induisant ainsi la transcription de PPAR α lui-même (Pineda-Torra *et al.*, 2002). Un tel mécanisme explique donc comment une modification post-transcriptionnelle de PPAR α par FAT10 peut se répercuter sur l'expression génique de PPAR α . Ainsi, dans un contexte de NASH, la surexpression de FAT10 favorise son interaction avec PPAR α ce qui conduit à un blocage de son activité inhibant l'expression de ses gènes cibles, dont lui-même.

4) Impact de la régulation de l'activité de PPAR α par FAT10 sur le métabolisme des lipides

Nos résultats démontrent que la modulation de l'activité de PPAR α par FAT10 impacte l'expression de certains de ses gènes cibles impliqués dans la régulation du métabolisme des lipides. On constate notamment une forte régulation du gène *HMGCS2* par la modulation de FAT10 *in vivo* et *in vitro*. De façon intéressante, ce gène, codant pour l'enzyme limitante de la cétogenèse, a été identifié comme un gène clé dans la prévention de la stéatose. En effet, Asif *et al.*, ont étudié des souris déficientes pour *Hmgcs2* et ont démontré que ces souris développent une stéatose plus sévère que les souris sauvages en réponse à un régime riche en graisse administré pendant 32 semaines. Au contraire, les souris nourries avec le même régime pendant 32 semaines et ayant été infectées avec un adénovirus induisant la surexpression d'*Hmgcs2* présentent une diminution significative de la stéatose (Asif *et al.*, 2022). *In vitro*, les travaux de Vilà-Braun *et al.*, sont en accord avec ces données et démontrent que la transfection des HepG2 avec un shARN ciblant *HMGCS2* inhibe l'oxydation des acides gras dépendante de PPAR α . Ainsi, HMGCS2 est nécessaire à l'induction de l'oxydation des acides gras par PPAR α dans

les HepG2 (Vilà-Brau *et al.*, 2011). De plus, il a été démontré que l'augmentation de l'expression d'*Hmgcs2*, observée en réponse à un jeûne de 24 heures, est inhibée dans le foie des souris déficientes pour *Ppara* spécifiquement dans les hépatocytes (*Ppara*^{hep^{-/-}}) (Montagner *et al.*, 2016). Ces données démontrent donc que la régulation de l'expression d'*HMGCS2* par FAT10 dans nos différents modèles est dépendante de PPAR α et impacte le métabolisme des lipides. Dans le cadre de notre étude, nous observons que l'augmentation de l'expression de gènes cibles de *Ppara*, tels qu'*Acox1*, *Cyp4a14* ou *Cyp4a10*, en réponse à un jeûne de 18 heures ou à un traitement au pémafibrate est diminuée dans le foie des souris surexprimant *Fat10*. Or, Montagner *et al.*, observent également que l'augmentation de l'expression de ces gènes en réponse à un jeûne de 24 heures dans le foie des souris contrôles n'est pas retrouvée dans le foie des souris *Ppara*^{hep^{-/-}}. Ce résultat montre donc que l'expression de ces gènes retranscrit fidèlement l'activité de *Ppara* dans les hépatocytes. Ainsi, par le biais de la mesure de l'expression de gènes cibles de *Ppara*, nous démontrons que l'activité du récepteur nucléaire est inhibée lors de la surexpression de *Fat10*. *In vitro*, nous mesurons aussi l'expression de PDK4 en tant que gène cible de PPAR α . En effet, PDK4 est un gène codant pour la kinase qui phosphoryle la PDH (Pyruvate Déshydrogénase) inhibant ainsi la conversion du pyruvate issu de la glycolyse en acetyl-CoA. L'action de PDK4 favorise donc la transition énergétique entre utilisation du glucose et utilisation des lipides. De façon intéressante, la surexpression de PPAR α dans les cellules MDA-MB-231 induit l'expression de *PDK4* et est associée à une activation de la β -oxydation mitochondriale. De plus, les rats traités pendant 50 semaines avec l'acide tétradécylthioacétique, connu pour activer l'oxydation des acides gras, présentent une augmentation de l'expression de *Pdk4*. Ces résultats suggèrent que l'expression de *Pdk4* est un marqueur de l'efficacité de l'oxydation des acides gras mitochondriale (Pettersen *et al.*, 2019). De plus, l'expression de *Pdk4* est fortement induite dans les foies murins et dans les hépatocytes primaires humains suite à un traitement au pémafibrate, un agoniste sélectif de PPAR α , ce qui montre que l'expression de *PDK4* dans le foie est majoritairement régulée par PPAR α (Sasaki *et al.*, 2019). Ainsi, la diminution de l'expression des gènes cibles que nous mesurons lors de la surexpression de FAT10 est le reflet de la diminution de l'activité de PPAR α et des mécanismes d'oxydation des acides gras, particulièrement la β -oxydation mitochondriale.

Ainsi, nous observons l'impact de la modulation de FAT10 directement sur la capacité des cellules à métaboliser les lipides notamment par la mesure de la respiration mitochondriale. Cependant, il est à noter que PPAR α promeut aussi l'expression de gènes impliqués dans biogenèse des mitochondries ou des gènes de la chaîne respiratoire, tels que *Tfam* ou *ND1*. En effet, dans le foie des souris traitées au fénofibrate, les mitochondries ne sont pas plus nombreuses mais occupent une plus large surface et sont plus actives métaboliquement (Iershov *et al.*, 2019). Il serait alors intéressant d'observer l'impact de la régulation de FAT10 sur la biogenèse mitochondriale dépendante de PPAR α afin de confirmer que la régulation de la respiration mitochondriale par FAT10 que nous observons n'est due

qu'à la modulation des gènes de la β -oxydation ou si FAT10 a également un impact sur la biogenèse mitochondriale via PPAR α .

Nous nous sommes aussi posé la question de l'existence d'une boucle de régulation entre FAT10 et PPAR α . En effet, comme expliqué précédemment, l'expression de *FAT10* est induite dans des conditions pro-inflammatoires mais PPAR α exerce une fonction anti-inflammatoire via son mécanisme de transrépression (Pawlak *et al.*, 2014). Cette répression s'applique notamment à la voie NF- κ B puisqu'il a été montré que PPAR α interagit avec c-Jun et p65 ce qui conduit à une inhibition de l'activité transcriptionnelle de NF- κ B et, notamment, à une transcription réduite d'IL6 (Delerive *et al.*, 1999). Or, la voie NF- κ B, ainsi que les cytokines pro-inflammatoires tels que TNF α , IFN γ et IL6 induisent l'expression de FAT10 dans les hépatocytes (Choi, Kim and Yoo, 2014b; Luo *et al.*, 2018). Nous avons donc envisagé que PPAR α puisse à son tour réprimer l'inflammation et donc l'expression de FAT10 dans nos modèles. Cependant, *in vitro*, la transfection des HepG2 avec le siPPAR α ne semble pas favoriser l'expression de FAT10 (**Fig. 37**). De plus, *in vivo*, nous avons mesuré l'expression de *Fat10* dans les foies de souris d'abord traitées avec du LPS induisant une inflammation aiguë, puis traitées avec un agoniste de Ppar α , le fénofibrate (données non-montrées). L'activation de Ppar α par le fénofibrate n'a pas d'impact sur l'expression hépatique de *Fat10* dans ces conditions et ces résultats suggèrent donc qu'il n'existe pas de régulation de FAT10 par PPAR α et exclut l'existence d'une boucle de rétro-contrôle entre les deux protéines.

5) Limitations du modèle CDAA dans l'étude de l'impact de FAT10 sur l'activité de PPAR α

Dans le cadre de ce projet de thèse, nous avons développé un modèle de NASH induite par le régime CDAA. Ce régime a pour avantage de favoriser un développement rapide des paramètres histologiques de la maladie et nous montrons que 2 semaines d'exposition à ce régime sont suffisantes pour induire l'expression de *Fat10* dans les hépatocytes murins. Or, l'étude des souris déficientes pour *Fat10* nourries avec un régime Chow démontre une réduction de l'adiposité, une meilleure sensibilité à l'insuline et une meilleure tolérance au glucose pour les souris déficientes pour *Fat10* par rapport aux souris sauvages (Canaan *et al.*, 2014). Cela suggère donc que FAT10 favorise le développement de l'IR et de l'obésité. Malheureusement, l'exposition au régime CDAA n'induit pas d'obésité ni d'insulino-résistance et ne permet pas de décrire l'ensemble des paramètres caractéristiques du syndrome métabolique observés chez l'humain. Or, comme mentionné dans l'introduction de ce manuscrit, ces deux paramètres contribuent fortement au développement des NAFLD (Haas, Francque and Staels, 2016) et le CDAA ne permet pas d'évaluer la contribution de ces paramètres dans l'étude de l'impact de FAT10 sur l'expression et l'activité de PPAR α . Ainsi, dans le but de mieux caractériser la surexpression de *Fat10* dans un contexte de NASH, nous avons démontré que *Fat10* est surexprimé

dans le foie de souris développant une NASH en réponse à 24 semaines d'exposition à un régime riche en graisses et enrichi en cholestérol (HFHSHC) développé au sein du laboratoire (Haas *et al.*, 2019). Ce résultat montre que la surexpression de FAT10 est aussi observée dans le foie d'individus développant une NASH associée à une obésité et à une IR. Ainsi, il serait intéressant d'étudier le développement de ces deux paramètres, en parallèle du développement de la NASH, dans un modèle de souris nourries avec un HFHSHC pour lesquelles l'expression de *Fat10* est inhibée.

Lors du travail de thèse présenté dans ce manuscrit, la modulation de *Fat10* fait intervenir un adénovirus permettant la surexpression de *Fat10*. À l'avenir, nous souhaitons moduler l'expression de *Fat10* spécifiquement dans les hépatocytes de souris dans le but de les nourrir avec un régime NASHogène (CDAA et/ ou HFHSHC). Pour cela, la mise en place d'une stratégie AAV (Adeno-Associated Virus) est envisagée au sein de l'équipe. En effet, l'utilisation d'un AAV permet l'intégration d'un transgène au génome des cellules. De plus, les AAV peuvent être utilisés comme vecteurs de plasmides induisant la surexpression du gène d'intérêt ou, au contraire, comme vecteurs d'un shARN diminuant l'expression de ce même gène. L'utilisation de tels AAV permettrait donc de moduler l'expression de *Fat10* spécifiquement dans les hépatocytes murins en choisissant un sérotype spécifique à ce type cellulaire (Du *et al.*, 2020) et en plaçant les gènes d'intérêt sous le contrôle d'un promoteur spécifique des hépatocytes (TBG ou CAG)(Yan, Yan and Ou, 2012). Le principal avantage de cette stratégie, plus pérenne dans le temps, est la possibilité d'y combiner l'utilisation d'un régime NASHogène sur plusieurs semaines. Malgré la rapidité avec laquelle un tel modèle peut être généré, la principale difficulté réside dans l'infection des souris qui se fait par injection en intraveineuse ce qui induit une toxicité et une inflammation pouvant être sources de variabilité. Pour remédier à ce problème, la mise en place d'une lignée stable de souris déficientes pour *Fat10*, spécifiquement dans les hépatocytes par recombinaison homologue est en cours de développement dans l'équipe. Cette stratégie, plus longue à mettre en œuvre, implique le croisement de souris floxées pour le gène *Fat10* avec des souris exprimant le gène de la cre-recombinase sous contrôle du promoteur de l'albumine, gène exprimé uniquement dans les hépatocytes (Montagner *et al.*, 2016). Une fois obtenues, ces souris pourront être soumises à un régime NASHogène sur plusieurs semaines afin de tester l'hypothèse de l'implication de *Fat10* dans le développement de la NASH.

6) Effets bénéfiques de l'inhibition de l'expression de FAT10 sur le métabolisme des lipides et la prévention de la NASH

Dans le cadre de notre étude, nous démontrons que la surexpression de *Fat10* dans le foie de souris altère l'activité de *Ppara* *in vivo*. De façon intéressante, les souris qui au contraire présentent une déficience pour *Fat10* ont été étudiées par le passé. En effet, Cnaan et al démontrent que la

déficiences pour *Fat10* est associée à une meilleure expression de gènes de la β -oxydation, dont *Ppara*, dans le muscle squelettique. De plus ces souris présentent une diminution de la masse grasse associée à une diminution de la taille des adipocytes (Canaan *et al.*, 2014). Cette observation est en lien avec les résultats de Zaho *et al.*, démontrant que la diminution de l'expression de *Fat10* inhibe l'adipogenèse de pré-adipocytes intramusculaires et sous-cutanés porcins en diminuant notamment l'expression de *Ppar γ* , *Srebp-1c* ou *Atgl* (Zhao *et al.*, 2018). Ces résultats suggèrent un effet bénéfique de l'inhibition de l'expression de *FAT10* sur le métabolisme des lipides dans le tissu adipeux et le muscle, et, par nos travaux, nous démontrons que c'est aussi le cas dans les hépatocytes. En effet, nos résultats démontrent que l'inhibition de *FAT10 in vitro* favorise l'activité de PPAR α et apporte une meilleure compréhension des rôles métaboliques de *FAT10*.

De plus, nos données montrent qu'une inhibition de l'expression de *FAT10* favorise l'activité de PPAR α en réponse à un traitement avec un agoniste spécifique, le pémafibrate, *in vitro*. Ces données confirment nos observations précédentes en montrant que *FAT10* réprime l'activité de PPAR α en réponse à un stimulus endogène, tel que le jeûne. De telles observations permettent de proposer une hypothèse expliquant les résultats décevants obtenus avec les agonistes de PPAR α pour le traitement de la NASH lors d'essais cliniques. En effet, les essais cliniques pour l'utilisation du fénofibrate, un mono-agoniste PPAR α ont été stoppés du fait de son inefficacité (Oscarsson *et al.*, 2018). De plus, l'étude de phase 3 de l'élafibranor, dual-agoniste PPAR α/δ , n'a pas permis de confirmer chez l'humain les résultats positifs obtenus sur des modèles pré-cliniques (Ratziu *et al.*, 2016a). Ces agonistes ciblent préférentiellement le foie pour y activer PPAR α et favoriser le métabolisme des lipides. Or, nous démontrons que, dans le foie des patients atteints de NASH, *FAT10* est surexprimée et bloque l'activité du PPAR α ce qui peut expliquer la difficulté d'activer le récepteur nucléaire et donc l'inefficacité des agonistes. Seul le pan-agoniste ciblant les 3 isotypes de PPAR, le lanifibranor, semble avoir plus de succès dans le traitement de la NASH (Francque *et al.*, 2021). Les études récentes sur les modèles précliniques démontrent notamment une meilleure efficacité de ce composé que les mono-agonistes des PPAR administrés individuellement (Lefere *et al.*, 2020). Ces données suggèrent que l'activation de PPAR α seul chez les patients atteints de NASH ne suffit pas et que l'agonisme des autres isotypes de PPAR, ayant des rôles extra-hépatiques, participe également à la résolution de la maladie. Ainsi, il serait intéressant d'étudier l'impact de *FAT10* sur les autres isotypes de PPAR dans le foie mais aussi dans les autres tissus métaboliques afin de déterminer si le rôle de *FAT10* se restreint à PPAR α et au foie. L'étude du tissu adipeux blanc semble particulièrement à propos puisque *FAT10* régule négativement l'adipogenèse et l'expression de *Ppar γ* dans les pré-adipocytes porcins (Zhao *et al.*, 2018). L'étude du muscle squelettique est aussi envisageable puisque les souris déficientes pour *Fat10* présentent une diminution de l'expression de *Ppara* dans le muscle. De façon intéressante, l'expression de *Ppar δ* n'est, quant à elle, pas modulée par la déficience en *Fat10* dans le muscle squelettique ce qui suggère que

Fat10 régule uniquement Ppar α dans ce tissu (Canaan *et al.*, 2014). L'étude de ces tissus est d'autant plus pertinente que lors du développement du syndrome métabolique, l'inflammation chronique n'atteint pas seulement le foie mais aussi les autres tissus métaboliques, comme par exemple le tissu adipeux (Schmidt *et al.*, 2022). Ainsi, les stimuli pro-inflammatoires observés au sein de ces tissus pendant le développement de l'obésité et du syndrome métabolique sont susceptibles d'induire l'expression de FAT10 qui pourrait alors avoir un rôle métabolique également dans ces tissus.

Ainsi, l'ensemble des résultats que nous avons obtenu et ceux issus de la littérature semblent indiquer que l'inhibition de FAT10 favorise le métabolisme des lipides, notamment en restaurant l'activité de PPAR α . Bloquer l'activité de FAT10 dans un contexte de NASH serait donc une stratégie thérapeutique envisageable afin de favoriser l'activité hépatoprotectrice de PPAR α . De façon intéressante, l'inhibition de FAT10 a déjà été étudiée *in vitro*, et les auteurs ont démontré qu'une molécule inhibitrice de JAK2 (AZ960) bloque l'expression de FAT10 dans la lignée cellulaire des HEK293T traitées avec un cocktail de TNF α /IFN γ , en inhibant indirectement les voies STAT1/3/5 (Reznik *et al.*, 2019). Cependant, les auteurs n'étudient pas les effets fonctionnels de cette molécule et cibler indirectement FAT10 via la voie JAK2 est peu spécifique et risque d'influencer d'autres voies de signalisation en aval. Au-delà de l'expression de FAT10, l'inhibition du mécanisme de FATylation pourrait aussi être envisagée. De tels inhibiteurs ont déjà été développés pour d'autres ubiquitin-like, notamment NEDD8 avec le pevonedistat (MLN4924) qui bloque la NEDDylation. Cette inhibition se produit lors de fixation de l'enzyme E1 de NEDD8 : NAE (NEDD8-activating enzyme) conduisant à la formation d'un thioester liant NEDD8 et NAE. Le MLN4924 réagit alors avec ce thioester pour former un adduit qui ne peut plus être pris en charge par l'enzyme E2 de la NEDDylation : UBC12 (Ubiquitin-Conjugating enzyme E2M)(Brownell *et al.*, 2010). Le pevonedistat est actuellement utilisé pour traiter les syndromes myélodysplasiques à haut risque (Luo *et al.*, 2012; Adès *et al.*, 2022). Cette stratégie est risquée car les ligases participant à la FATylation ne sont pas spécifiques à FAT10 mais interviennent aussi dans l'ubiquitylation. Ainsi, développer une molécule permettant de bloquer ou de déstabiliser spécifiquement l'interaction FAT10/PPAR α serait un moyen de gagner en spécificité. Les données présentées lors de cette thèse ont notamment donné lieu à un projet, financé par l'Institut Pasteur de Lille, visant à mettre en place un test cellulaire permettant de cribler une bibliothèque de molécules dans le but de trouver un candidat susceptible de prévenir l'interaction entre FAT10 et PPAR α .

Conclusion générale de la thèse

Ce projet de thèse a pour objectif d'étudier la régulation de l'expression et de l'activité de PPAR α dans un contexte de NASH. Une première étude de données transcriptomiques issues de foies humains de patients atteints de NAFLD a permis d'**identifier un gène surexprimé lors du développement de la NASH : FAT10**. La surexpression de FAT10, validée à l'échelle protéique par immunofluorescence sur des coupes des foies de patients, est positivement corrélée à la sévérité de la maladie ainsi qu'à certains gènes de l'inflammation. De plus, l'expression de *FAT10* corrèle négativement avec l'expression de PPAR α et certains de ses gènes cibles impliqués dans les voies du métabolisme des lipides. Les données transcriptomiques analysées ont pu être complétées par les données issues des foies de patients atteints de NASH après 1 an de perte de poids suite à une chirurgie bariatrique ou à l'application de RHD. Ces données démontrent que l'expression de *FAT10* diminue chez les patients régressant leurs paramètres de NASH et pour lesquels une restauration de l'expression et de l'activité de PPAR α a été mise en évidence.

Ces différents résultats ont été reproduits dans un modèle murin de NASH induite par un régime CDAA. En effet, la surexpression de *Fat10* est observée dans le foie des souris atteintes de NASH et l'isolement des cellules du foie de ces souris a permis de prouver que cette surexpression est spécifique des hépatocytes. Ainsi dans les hépatocytes murins, l'expression de *Fat10* corrèle positivement à l'expression de gènes pro-inflammatoires et négativement avec l'expression de *Ppara* et de certains de ses gènes cibles.

Pour mieux comprendre le **mécanisme d'action de FAT10 sur PPAR α** , l'étude d'une éventuelle interaction entre les deux protéines a été menée. *In vitro*, un modèle de surexpression endogène de FAT10 sur des lignées d'hépatocytes humains a permis d'identifier une interaction covalente entre FAT10 et PPAR α , s'accumulant lors de la surexpression de FAT10. De plus, la modulation de ces interactions semble passer par les voies de dégradations protéiques du protéasome et de l'autophagie. Le marquage *in situ* des interactions sur des coupes de foies humains et murins a permis de valider la formation d'une interaction entre FAT10 et PPAR α *in vivo* dans un contexte de NASH.

Ensuite, notre projet a eu pour but d'étudier **l'impact de la modulation de FAT10 sur l'activité de PPAR α** . Ainsi, nos résultats obtenus *in vitro* démontrent que l'inhibition de l'expression de *FAT10* promeut l'activité transcriptionnelle de PPAR α ce qui a pour conséquence de favoriser l'expression de gènes cibles de PPAR α impliqués dans le métabolisme des lipides. De plus, l'analyse de la respiration

mitochondriale et du contenu en gouttelettes lipidiques des cellules pour lesquelles l'expression de *FAT10* est inhibée a mis en évidence un meilleur métabolisme des lipides dépendant de la voie PPAR α . Au contraire, la surexpression stable de *FAT10* dans les hépatocytes *in vitro* démontre une répression de l'activité transcriptionnelle de PPAR α et du métabolisme des lipides associé. *In vivo*, l'analyse de l'expression de PPAR α et de ses gènes cibles dans le foie des souris surexprimant *Fat10* démontre une inhibition de l'activité de PPAR α en réponse à un jeûne long indiquant ainsi un rôle de régulateur négatif de *FAT10* pour PPAR α .

Enfin, l'étude de l'impact de la modulation de *FAT10* sur la réponse de PPAR α à son agoniste a permis de valider les observations précédentes. En effet *in vitro*, l'inhibition de l'expression de *FAT10* promeut l'induction des gènes cibles de PPAR α dans les hépatocytes traités avec un agoniste, le pémafibrate, alors que la surexpression stable, au contraire, réprime cette induction. De même, *in vivo*, la surexpression hépatique de *Fat10* bloque l'expression des gènes cibles de PPAR α en réponse à un traitement au pémafibrate.

Finalement, l'ensemble des travaux présentés lors de cette thèse ont permis d'identifier un nouveau régulateur négatif et post-traductionnel de l'activité de PPAR α lors du développement de la NASH : *FAT10*. Cette découverte ouvre la voie vers une meilleure compréhension des mécanismes d'action des agonistes de PPAR α , et ainsi mieux cerner les difficultés à cibler ce récepteur nucléaire.

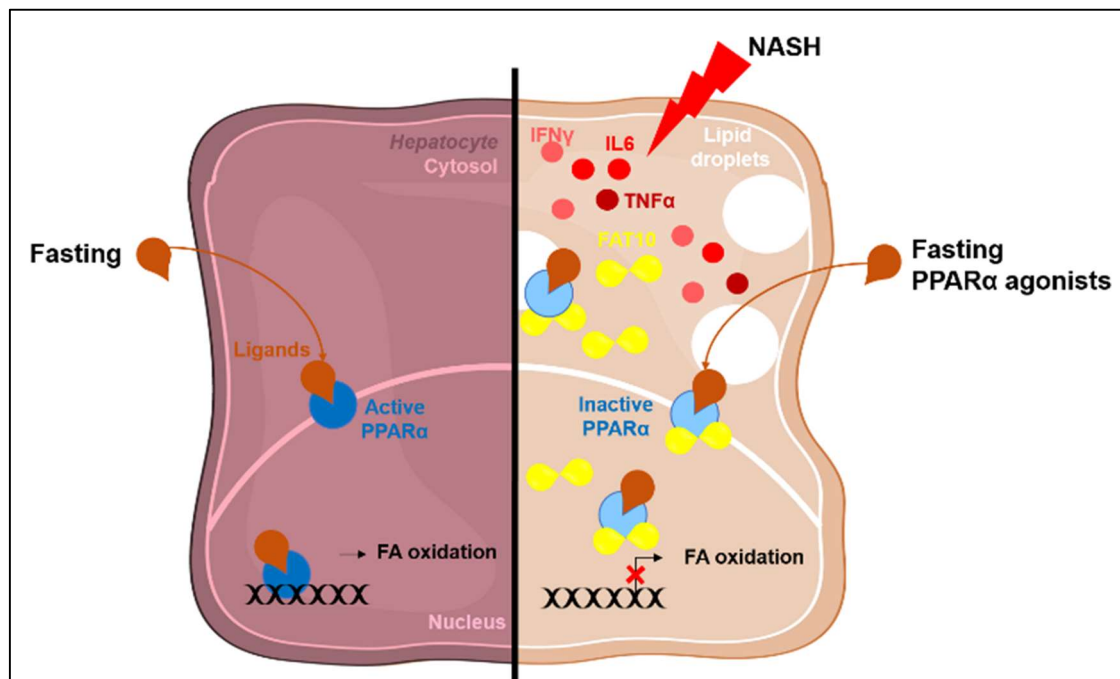


Figure 44 : Schéma-Bilan.

Schéma récapitulatif des conclusions du projet de thèse à l'échelle d'un hépatocyte en comparant le fonctionnement physiologique (à gauche) et physiopathologique (à droite).

Bibliographie

- Adès, L. *et al.* (2022) 'Pevonedistat plus azacitidine vs azacitidine alone in higher-risk MDS/chronic myelomonocytic leukemia or low-blast percentage AML', *Blood Advances*. doi: 10.1182/bloodadvances.2022007334.
- Aichem, A. *et al.* (2010) 'USE1 is a bispecific conjugating enzyme for ubiquitin and FAT10, which FAT10ylates itself in cis', *Nature Communications*. Nature Publishing Group, 1(2). doi: 10.1038/ncomms1012.
- Aichem, A. *et al.* (2012) 'The proteomic analysis of endogenous FAT10 substrates identifies p62 / SQSTM1 as a substrate of FAT10ylation', *Journal of Cell Science*, 53, pp. 4576–4585. doi: 10.1242/jcs.107789.
- Aichem, A. *et al.* (2018) 'The structure of the ubiquitin-like modifier FAT10 reveals an alternative targeting mechanism for proteasomal degradation', *Nature Communications*. Springer US, 9(1), pp. 1–14. doi: 10.1038/s41467-018-05776-3.
- Aichem, A., Boehm, A. N., *et al.* (2019) *Analysis of modification and proteolytic targeting by the ubiquitin-like modifier FAT10*. 1st edn, *Methods in Enzymology*. 1st edn. Elsevier Inc. doi: 10.1016/bs.mie.2018.12.040.
- Aichem, A., Sailer, C., *et al.* (2019) 'The ubiquitin-like modifier FAT10 interferes with SUMO activation', *Nature Communications*. Springer US, 10(1). doi: 10.1038/s41467-019-12430-z.
- Aichem, A., Catone, N. and Groettrup, M. (2014) 'Investigations into the auto-FAT10ylation of the bispecific E2 conjugating enzyme UBA6-specific E2 enzyme 1', *FEBS journal*, 281, pp. 1848–1859. doi: 10.1111/febs.12745.
- Aichem, A. and Groettrup, M. (2020) 'The ubiquitin-like modifier FAT10 - much more than a proteasome-targeting signal', *Journal of cell science*, 133(14). doi: 10.1242/jcs.246041.
- Alves-Bezerra, M. and Cohen, D. E. (2018) 'Triglyceride metabolism in the liver', *Comprehensive Physiology*, 8(1), pp. 1–22. doi: 10.1002/cphy.c170012.
- Ameer, F. *et al.* (2014) 'De novo lipogenesis in health and disease', *Metabolism: Clinical and Experimental*. Elsevier Inc., 63(7), pp. 895–902. doi: 10.1016/j.metabol.2014.04.003.
- Aoyama, T. *et al.* (1998) 'Altered constitutive expression of fatty acid-metabolizing enzymes in mice lacking the peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α)', *Journal of Biological Chemistry*. © 1998 ASBMB. Currently published by Elsevier Inc; originally published by American Society for Biochemistry and Molecular Biology., 273(10), pp. 5678–5684. doi: 10.1074/jbc.273.10.5678.
- Aranda, A. and Pascual, A. (2001) 'Nuclear hormone receptors and gene expression', *Physiological Reviews*, 81(3), pp. 1269–1304. doi: 10.1152/physrev.2001.81.3.1269.
- Arendt, B. M. *et al.* (2019) 'Cancer-related gene expression is associated with disease severity and modifiable lifestyle factors in non-alcoholic fatty liver disease', *Nutrition*. Elsevier Inc., 62, pp. 100–107. doi: 10.1016/j.nut.2018.12.001.
- Ashley Cowart, L. *et al.* (2002) 'The CYP4A isoforms hydroxylate epoxyeicosatrienoic acids to form high affinity peroxisome proliferator-activated receptor ligands', *Journal of Biological Chemistry*. © 2002 ASBMB. Currently published by Elsevier Inc; originally published by American Society for Biochemistry and Molecular Biology., 277(38), pp. 35105–35112. doi: 10.1074/jbc.M201575200.
- Asif, S. *et al.* (2022) 'Hmgcs2-mediated ketogenesis modulates high-fat diet-induced hepatosteatosis', *Molecular Metabolism*. The Author(s), 61(April), p. 101494. doi: 10.1016/j.molmet.2022.101494.
- Badman, M. K. *et al.* (2007) 'Hepatic Fibroblast Growth Factor 21 Is Regulated by PPAR α and Is a Key Mediator of Hepatic Lipid Metabolism in Ketotic States', *Cell Metabolism*, 5(6), pp. 426–437. doi: 10.1016/j.cmet.2007.05.002.
- Barclay, T. B. *et al.* (1999) 'Modulation of cytochrome P-450 gene expression in endotoxemic mice is tissue specific and peroxisome proliferator-activated receptor- α dependent', *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 290(3), pp. 1250–1257.
- Basler, M., Buerger, S. and Groettrup, M. (2015) 'The ubiquitin-like modifier FAT10 in antigen processing and antimicrobial defense', *Molecular Immunology*. Elsevier Ltd, 68(2), pp. 129–132. doi: 10.1016/j.molimm.2015.04.012.
- Bechmann, L. P. *et al.* (2012) 'The interaction of hepatic lipid and glucose metabolism in liver diseases', *Journal of Hepatology*, 56(4), pp. 952–964. doi: 10.1016/j.jhep.2011.08.025.
- Bedossa, P. *et al.* (2014) 'Utility and appropriateness of the fatty liver inhibition of progression (FLIP) algorithm and steatosis, activity, and fibrosis (SAF) score in the evaluation of biopsies of nonalcoholic fatty liver disease', *Hepatology*,

60(2), pp. 565–575. doi: 10.1002/hep.27173.

Bénardeau, A. *et al.* (2009) 'Aleglitazar, a new, potent, and balanced dual PPAR α / γ agonist for the treatment of type II diabetes', *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. Elsevier Ltd, 19(9), pp. 2468–2473. doi: 10.1016/j.bmcl.2009.03.036.

Berthier, A. *et al.* (2021) 'PPARs in liver physiology', *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*. Elsevier B.V., 1867(5), p. 166097. doi: 10.1016/j.bbdis.2021.166097.

Bialas, J. *et al.* (2019) 'The ubiquitin-like modifier FAT10 stimulates the activity of deubiquitylating enzyme OTUB1', *Journal of Biological Chemistry*, 294(12), pp. 4315–4330. doi: 10.1074/jbc.RA118.005406.

Bialas, J., Groettrup, M. and Aichem, A. (2015) 'Conjugation of the ubiquitin activating enzyme UBE1 with the ubiquitin-like modifier FAT10 targets it for proteasomal degradation', *PLoS ONE*, 10(3), pp. 1–16. doi: 10.1371/journal.pone.0120329.

Blanquart, C. *et al.* (2002) 'Peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α) turnover by the ubiquitin-proteasome system controls the ligand-induced expression level of its target genes', *Journal of Biological Chemistry*, 277(40), pp. 37254–37259. doi: 10.1074/jbc.M110598200.

Blanquart, C. *et al.* (2004) 'The protein kinase C signaling pathway regulates a molecular switch between transactivation and transrepression activity of the peroxisome proliferator-activated receptor α ', *Molecular Endocrinology*, 18(8), pp. 1906–1918. doi: 10.1210/me.2003-0327.

BLANQUART, C. *et al.* (2004) 'Ppara (Peroxisome Proliferator- Activated Receptor Alpha) Un Récepteur Nucléaire Impliqué Dans La Régulation Du Métabolisme Des Lipides Et Des Lipoprotéines Ainsi Que Dans La Réponse Inflammatoire', *Flammarion Médecine-Sciences*, 2004, pp. 20–31.

Boland, M. L. *et al.* (2019) 'Towards a standard diet-induced and biopsy-confirmed mouse model of non-alcoholic steatohepatitis: Impact of dietary fat source', *World Journal of Gastroenterology*, 25(33), pp. 4904–4920. doi: 10.3748/wjg.v25.i33.4904.

Bougarne, N. *et al.* (2019) 'Mechanisms Underlying the Functional Cooperation Between PPAR α and GR α to Attenuate Inflammatory Responses', *Frontiers in Immunology*, 10(August), p. 1769. doi: 10.3389/fimmu.2019.01769.

Bronner, M., Hertz, R. and Bar-Tana, J. (2004) 'Kinase-independent transcriptional co-activation of peroxisome proliferator-activated receptor α by AMP-activated protein kinase', *Biochemical Journal*, 384(2), pp. 295–305. doi: 10.1042/BJ20040955.

Brown, P. J. *et al.* (2001) 'Identification of a subtype selective human PPAR α agonist through parallel-array synthesis', *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 11(9), pp. 1225–1227. doi: 10.1016/S0960-894X(01)00188-3.

Brownell, J. E. *et al.* (2010) 'Substrate-Assisted Inhibition of Ubiquitin-like Protein-Activating Enzymes: The NEDD8 E1 Inhibitor MLN4924 Forms a NEDD8-AMP Mimetic In Situ', *Molecular Cell*. Elsevier Ltd, 37(1), pp. 102–111. doi: 10.1016/j.molcel.2009.12.024.

Brunmeir, R. and Xu, F. (2018) 'Functional regulation of PPARs through post-translational modifications', *International Journal of Molecular Sciences*, 19(6). doi: 10.3390/ijms19061738.

Buchsbaum, S., Bercovich, B. and Ciechanover, A. (2012) 'FAT10 is a proteasomal degradation signal that is itself regulated by ubiquitination', *Molecular Biology of the Cell*. doi: 10.1091/mbc.E11-07-0609.

Buerger, S. *et al.* (2015) 'The Ubiquitin-like Modifier FAT10 Is Selectively Expressed in Medullary Thymic Epithelial Cells and Modifies T Cell Selection', *The Journal of Immunology*, 195(9), pp. 4106–4116. doi: 10.4049/jimmunol.1500592.

Buzzetti, E., Pinzani, M. and Tsochatzis, E. A. (2016) 'The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD)', *Metabolism: Clinical and Experimental*. Elsevier Inc., 65(8), pp. 1038–1048. doi: 10.1016/j.metabol.2015.12.012.

Cai, J., Zhang, X. J. and Li, H. (2019) 'The Role of Innate Immune Cells in Nonalcoholic Steatohepatitis', *Hepatology*, 70(3), pp. 1026–1037. doi: 10.1002/hep.30506.

Canaan, A. *et al.* (2006) 'FAT10/Diubiquitin-Like Protein-Deficient Mice Exhibit Minimal Phenotypic Differences', *Molecular and Cellular Biology*. doi: 10.1128/MCB.00966-05.

Canaan, A. *et al.* (2014) 'Extended lifespan and reduced adiposity in mice lacking the FAT10 gene', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(14), pp. 5313–5318. doi: 10.1073/pnas.1323426111.

Cappadocia, L. and Lima, C. D. (2018) 'Ubiquitin-like Protein Conjugation: Structures, Chemistry, and Mechanism', *Chemical Reviews*, 118(3), pp. 889–918. doi: 10.1021/acs.chemrev.6b00737.

Cariou, B. *et al.* (2013) 'Dual peroxisome proliferator- activated receptor α / δ agonist gft505 improves hepatic and peripheral insulin sensitivity in abdominally obese subjects', *Diabetes Care*, 36(10), pp. 2923–2930. doi: 10.2337/dc12-2012.

- Caussey, C., Aubin, A. and Loomba, R. (2021) 'The Relationship Between Type 2 Diabetes, NAFLD, and Cardiovascular Risk', *Current Diabetes Reports*, 21(5), pp. 1–21. doi: 10.1007/s11892-021-01383-7.
- Chalasani, N. *et al.* (2018) 'The diagnosis and management of nonalcoholic fatty liver disease: Practice guidance from the American Association for the Study of Liver Diseases', *Hepatology*, 67(1), pp. 328–357. doi: 10.1002/hep.29367.
- Chantal A. Rivera, Patrick Adegboyega, Nico van Rooijen, Arlene Tagalicud, Monique Allman, and M. W. (2007) 'Toll-like receptor-4 signaling and Kupffer cells play pivotal roles in the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis', *Journal of Hepatology*, 23(1), pp. 1–7.
- Chaudhary, R. *et al.* (2022) 'Intermittent fasting activates markers of autophagy in mouse liver, but not muscle from mouse or humans', *Nutrition*. Elsevier Inc., 101, p. 111662. doi: 10.1016/j.nut.2022.111662.
- Chen, H. *et al.* (1997) 'Nuclear receptor coactivator ACTR is a novel histone acetyltransferase and forms a multimeric activation complex with P/CAF and CBP/p300', *Cell*, 90(3), pp. 569–580. doi: 10.1016/S0092-8674(00)80516-4.
- Chen, W. *et al.* (2010) 'Patatin-like phospholipase domain-containing 3/adiponutrin deficiency in mice is not associated with fatty liver disease', *Hepatology*, 52(3), pp. 1134–1142. doi: 10.1002/hep.23812.
- Chen, Z., Zhang, W., *et al.* (2018) 'Ubiquitin-like protein FAT10 regulates DNA damage repair via modification of proliferating cell nuclear antigen', *Molecular Medicine Reports*, 17(6), pp. 7487–7496. doi: 10.3892/mmr.2018.8843.
- Chen, Z., Zhang, W. E. I., *et al.* (2018) 'Ubiquitin - like protein FAT10 regulates DNA damage repair via modification of proliferating cell nuclear antigen', *Molecular Medicine Reports*, pp. 7487–7496. doi: 10.3892/mmr.2018.8843.
- Chinetti, G. *et al.* (1998) 'Activation of proliferator-activated receptors α and γ induces apoptosis of human monocyte-derived macrophages', *Journal of Biological Chemistry*, 273(40), pp. 25573–25580. doi: 10.1074/jbc.273.40.25573.
- Chiu, Y. H., Sun, Q. and Chen, Z. J. (2007) 'E1-L2 Activates Both Ubiquitin and FAT10', *Molecular Cell*, 27(6), pp. 1014–1023. doi: 10.1016/j.molcel.2007.08.020.
- Cho, C. S. *et al.* (2018) 'Lipotoxicity induces hepatic protein inclusions through TANK binding kinase 1-mediated p62/sequestosome 1 phosphorylation', *Hepatology*, 68(4), pp. 1331–1346. doi: 10.1002/hep.29742.
- Choi, Y., Kim, J. K. and Yoo, J. Y. (2014a) 'NF κ B and STAT3 synergistically activate the expression of FAT10, a gene counteracting the tumor suppressor p53', *Molecular Oncology*. doi: 10.1016/j.molonc.2014.01.007.
- Choi, Y., Kim, J. K. and Yoo, J. Y. (2014b) 'NF κ B and STAT3 synergistically activate the expression of FAT10, a gene counteracting the tumor suppressor p53', *Molecular Oncology*, 8(3), pp. 642–655. doi: 10.1016/j.molonc.2014.01.007.
- Clementi, A. H. *et al.* (2009) 'Loss of Kupffer cells in diet-induced obesity is associated with increased hepatic steatosis, STAT3 signaling, and further decreases in insulin signaling', *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1792(11), pp. 1062–1072. doi: 10.1016/j.bbadis.2009.08.007.
- Cohen, D. E. (2013) 'Lipids and the liver', *Seminars in Liver Disease*, 33(4), pp. 299–300. doi: 10.1055/s-0033-1358518.
- Coleman, R. A. and Lee, D. P. (2004) 'Enzymes of triacylglycerol synthesis and their regulation', *Progress in Lipid Research*, 43(2), pp. 134–176. doi: 10.1016/S0163-7827(03)00051-1.
- Compe, E. *et al.* (2005) 'Dysregulation of the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Target Genes by XPD Mutations', *Molecular and Cellular Biology*, 25(14), pp. 6065–6076. doi: 10.1128/mcb.25.14.6065-6076.2005.
- Corless, J. K. and Middleton, H. M. (1983) 'Normal Liver Function: A Basis for Understanding Hepatic Disease', *Archives of Internal Medicine*, 143(12), pp. 2291–2294. doi: 10.1001/archinte.1983.00350120085018.
- Costet, P. *et al.* (1998) 'Peroxisome proliferator-activated receptor α -isoform deficiency leads to progressive dyslipidemia with sexually dimorphic obesity and steatosis', *Journal of Biological Chemistry*, 273(45), pp. 29577–29585. doi: 10.1074/jbc.273.45.29577.
- Croom, E. (2012) *Metabolism of xenobiotics of human environments*. 1st edn, *Progress in Molecular Biology and Translational Science*. 1st edn. Elsevier Inc. doi: 10.1016/B978-0-12-415813-9.00003-9.
- Cusi, K. *et al.* (2014) 'Limited value of plasma cytokeratin-18 as a biomarker for NASH and fibrosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease', *Journal of Hepatology*. European Association for the Study of the Liver, 60(1), pp. 167–174. doi: 10.1016/j.jhep.2013.07.042.
- Dai, B. *et al.* (2016) 'Upregulation of p-Smad2 contributes to FAT10-induced oncogenic activities in glioma', *Tumor Biology*. Tumor Biology, 37(7), pp. 8621–8631. doi: 10.1007/s13277-015-4739-6.

- Dalen, K. T. *et al.* (2006) 'PPAR α activators and fasting induce the expression of adipose differentiation-related protein in liver', *Journal of Lipid Research*, 47(5), pp. 931–943. doi: 10.1194/jlr.M500459-JLR200.
- Dali-Youcef, N. *et al.* (2019) 'Interleukin-32 Contributes to Human Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Insulin Resistance', *Hepatology Communications*, 3(9), pp. 1205–1220. doi: 10.1002/hep4.1396/supinfo.
- Delerive, P. *et al.* (1999) 'Peroxisome proliferator-activated receptor α negatively regulates the vascular inflammatory gene response by negative cross-talk with transcription factors NF- κ B and AP-1', *Journal of Biological Chemistry*. © 1999 ASBMB. Currently published by Elsevier Inc; originally published by American Society for Biochemistry and Molecular Biology., 274(45), pp. 32048–32054. doi: 10.1074/jbc.274.45.32048.
- Delerive, P. *et al.* (2000) 'Oxidized phospholipids activate PPAR α in a phospholipase A2-dependent manner', *FEBS Letters*, 471(1), pp. 34–38. doi: 10.1016/S0014-5793(00)01364-8.
- Deprince, A., Haas, J. T. and Staels, B. (2020) 'Dysregulated lipid metabolism links NAFLD to cardiovascular disease', *Molecular Metabolism*. Elsevier GmbH, 42(October), p. 101092. doi: 10.1016/j.molmet.2020.101092.
- Van Diepen, J. A. *et al.* (2014) 'PPAR-alpha dependent regulation of vanin-1 mediates hepatic lipid metabolism', *Journal of Hepatology*. European Association for the Study of the Liver, 61(2), pp. 366–372. doi: 10.1016/j.jhep.2014.04.013.
- Dong, D. *et al.* (2016) 'Ubiquitin-like protein FAT10 promotes bladder cancer progression by stabilizing survivin', *Oncotarget*, 7(49), pp. 81463–81473. doi: 10.18632/oncotarget.12976.
- Du, M. *et al.* (2020) 'Targeting NFATc4 attenuates non-alcoholic steatohepatitis in mice', *Journal of Hepatology*. Elsevier, 73(6), pp. 1333–1346. doi: 10.1016/j.jhep.2020.07.030.
- Dubois, V. *et al.* (2017) 'Distinct but complementary contributions of PPAR isotypes to energy homeostasis', *Journal of Clinical Investigation*, 127(4), pp. 1202–1214. doi: 10.1172/JCI88894.
- Dunning, S. *et al.* (2009) 'Superoxide anions and hydrogen peroxide inhibit proliferation of activated rat stellate cells and induce different modes of cell death', *Liver International*, 29(6), pp. 922–932. doi: 10.1111/j.1478-3231.2009.02004.x.
- Ebstein, F. *et al.* (2009) 'Maturation of human dendritic cells is accompanied by functional remodelling of the ubiquitin-proteasome system', *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 41(5), pp. 1205–1215. doi: 10.1016/j.biocel.2008.10.023.
- Ebstein, F., Lehmann, A. and Kloetzel, P. M. (2012) 'The FAT10- and ubiquitin-dependent degradation machineries exhibit common and distinct requirements for MHC class I antigen presentation', *Cellular and Molecular Life Sciences*, 69(14), pp. 2443–2454. doi: 10.1007/s00018-012-0933-5.
- Eslam, M. *et al.* (2020) 'MAFLD: A Consensus-Driven Proposed Nomenclature for Metabolic Associated Fatty Liver Disease', *Gastroenterology*. The American Gastroenterological Association, 158(7), pp. 1999-2014.e1. doi: 10.1053/j.gastro.2019.11.312.
- Estes, C. *et al.* (2018) 'Modeling NAFLD disease burden in China, France, Germany, Italy, Japan, Spain, United Kingdom, and United States for the period 2016–2030', *Journal of Hepatology*. European Association for the Study of the Liver, 69(4), pp. 896–904. doi: 10.1016/j.jhep.2018.05.036.
- Fan, C. Y. *et al.* (1996) 'Hepatocellular and hepatic peroxisomal alterations in mice with a disrupted peroxisomal fatty acyl-coenzyme A oxidase gene', *Journal of Biological Chemistry*. © 1996 ASBMB. Currently published by Elsevier Inc; originally published by American Society for Biochemistry and Molecular Biology., 271(40), pp. 24698–24710. doi: 10.1074/jbc.271.40.24698.
- Fan, W. *et al.* (1996) 'Identification of seven new human MHC class I region genes around the HLA-F locus', *Immunogenetics*, 44(2), pp. 97–103. doi: 10.1007/BF02660056.
- Feige, J. N. *et al.* (2005) 'Fluorescence imaging reveals the nuclear behavior of peroxisome proliferator-activated receptor/retinoid X receptor heterodimers in the absence and presence of ligand', *Journal of Biological Chemistry*, 280(18), pp. 17880–17890. doi: 10.1074/jbc.M500786200.
- Feige, J. N. *et al.* (2006) 'From molecular action to physiological outputs: Peroxisome proliferator-activated receptors are nuclear receptors at the crossroads of key cellular functions', *Progress in Lipid Research*, 45(2), pp. 120–159. doi: 10.1016/j.plipres.2005.12.002.
- Fiebig, T. *et al.* (2012) 'Three-dimensional in vivo imaging of the murine liver: A micro-computed tomography-based anatomical study', *PLoS ONE*, 7(2), pp. 1–9. doi: 10.1371/journal.pone.0031179.
- Fouad, Y. *et al.* (2022) 'The NAFLD-MAFLD debate: Is there a Consensus-on-Consensus methodology?', *Liver International*,

42(4), pp. 742–748. doi: 10.1111/liv.15197.

Fourcade, S. *et al.* (2001) 'Fibrate induction of the adrenoleukodystrophy-related gene (ABCD2): Promoter analysis and role of the peroxisome proliferator-activated receptor PPAR α ', *European Journal of Biochemistry*, 268(12), pp. 3490–3500. doi: 10.1046/j.1432-1327.2001.02249.x.

Fraile, J. M. *et al.* (2021) 'Non-alcoholic steatohepatitis (NASH) – A review of a crowded clinical landscape, driven by a complex disease', *Drug Design, Development and Therapy*, 15(September), pp. 3997–4009. doi: 10.2147/DDDT.S315724.

Franque, S. *et al.* (2015) 'PPAR α gene expression correlates with severity and histological treatment response in patients with Non-alcoholic Steatohepatitis', *JOURNAL OF HEPATOLOGY*. European Association for the Study of the Liver. doi: 10.1016/j.jhep.2015.02.019.

Franque, S. M. *et al.* (2021) 'A Randomized, Controlled Trial of the Pan-PPAR Agonist Lanifibranor in NASH', *New England Journal of Medicine*, 385(17), pp. 1547–1558. doi: 10.1056/nejmoa2036205.

Fransen, M., Lismont, C. and Walton, P. (2017) 'The peroxisome-mitochondria connection: How and why?', *International Journal of Molecular Sciences*, 18(6). doi: 10.3390/ijms18061126.

French, S. W. *et al.* (2011) 'The role of innate immunity in the pathogenesis of preneoplasia in drug-induced chronic hepatitis based on a mouse model', *Experimental and Molecular Pathology*, 91(3), pp. 653–659. doi: 10.1016/j.yexmp.2011.07.004.

French, S. W. *et al.* (2012) 'FAT10 knock out mice livers fail to develop Mallory-Denk bodies in the DDC mouse model', *Experimental and Molecular Pathology*. doi: 10.1016/j.yexmp.2012.09.002.

French SW, M. A. and P. Y. (2016) 'The mechanisms of Mallory-Denk bodies formation are Similar To the Formation of Aggregates in Alzheimer ' S Disease and Other Neurodegenerative', *Experimental and Molecular Pathology*, 100(3), pp. 426–433. doi: 10.1016/j.yexmp.2016.03.010.THE.

Friedman, S. L. (2008) 'Hepatic fibrosis-Overview', *Toxicology*, 254(3), pp. 120–129. doi: 10.1016/j.tox.2008.06.013.

Fruchart, J. C. (2013) 'Selective peroxisome proliferator-activated receptor α modulators (SPPARM α): The next generation of peroxisome proliferator-activated receptor α -agonists', *Cardiovascular Diabetology*, 12(1), pp. 1–8. doi: 10.1186/1475-2840-12-82.

Fukushima, H. *et al.* (2018) 'Formation of p62-positive inclusion body is associated with macrophage polarization in non-alcoholic fatty liver disease', *Hepatology Research*, 48(9), pp. 757–767. doi: 10.1111/hepr.13071.

Gao, Y. *et al.* (2014) 'FAT10, an ubiquitin-like protein, confers malignant properties in non-tumorigenic and tumorigenic cells', *Carcinogenesis*, 35(4), pp. 923–934. doi: 10.1093/carcin/bgt407.

Gao, Y. *et al.* (2015) 'Silibinin down-regulates FAT10 and modulate TNF- α /IFN- γ -induced chromosomal instability and apoptosis sensitivity', *Biology Open*. doi: 10.1242/bio.011189.

Gavin, J. M. *et al.* (2012) 'Mechanistic studies on activation of ubiquitin and di-ubiquitin-like protein, FAT10, by ubiquitin-like modifier activating enzyme 6, Uba6', *Journal of Biological Chemistry*. © 2012 ASBMB. Currently published by Elsevier Inc; originally published by American Society for Biochemistry and Molecular Biology., 287(19), pp. 15512–15522. doi: 10.1074/jbc.M111.336198.

Gawrieh, S. *et al.* (2021) *Saroglitazar, a PPAR- α / γ Agonist, for Treatment of NAFLD: A Randomized Controlled Double-Blind Phase 2 Trial*, *Hepatology*. doi: 10.1002/hep.31843.

Gerber, M. A. and Thung, S. N. (1987) 'Histology of the liver', *American Journal of Surgical Pathology*, pp. 709–722. doi: 10.1097/00000478-198709000-00007.

Gervois, P. *et al.* (1999) 'A truncated human peroxisome proliferator-activated receptor α splice variant with dominant negative activity', *Molecular Endocrinology*, 13(9), pp. 1535–1549. doi: 10.1210/mend.13.9.0341.

Gervois, P. *et al.* (2001) 'Negative Regulation of Human Fibrinogen Gene Expression by Peroxisome Proliferator-activated Receptor α Agonists via Inhibition of CCAAT Box/Enhancer-binding Protein β ', *Journal of Biological Chemistry*. © 2001 ASBMB. Currently published by Elsevier Inc; originally published by American Society for Biochemistry and Molecular Biology., 276(36), pp. 33471–33477. doi: 10.1074/jbc.M102839200.

Gervois, P. *et al.* (2004) 'Global Suppression of IL-6-induced Acute Phase Response Gene Expression after Chronic in Vivo Treatment with the Peroxisome Proliferator-activated Receptor- α Activator Fenofibrate', *Journal of Biological Chemistry*, 279(16), pp. 16154–16160. doi: 10.1074/jbc.M400346200.

Gissen, P. and Arias, I. M. (2015) 'Structural and functional hepatocyte polarity and liver disease', *Journal of Hepatology*.

- European Association for the Study of the Liver, 63(4), pp. 1023–1037. doi: 10.1016/j.jhep.2015.06.015.
- Gopinathan, L. *et al.* (2009) 'Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor- α by MDM2', *Toxicological Sciences*, 108(1), pp. 48–58. doi: 10.1093/toxsci/kfn260.
- Gore, E. *et al.* (2020) 'Investigating fibrosis and inflammation in an ex vivo NASH murine model', *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 318(2), pp. G336–G351. doi: 10.1152/AJPGI.00209.2019.
- Gruen, J. R. *et al.* (1996) 'A transcription map of the major histocompatibility complex (MHC) class I region', *Genomics*, 36(1), pp. 70–85. doi: 10.1006/geno.1996.0427.
- Guillou, H. *et al.* (2002) 'Comparative effect of fenofibrate on hepatic desaturases in wild-type and peroxisome proliferator-activated receptor α -deficient mice', *Lipids*, 37(10), pp. 981–989. doi: 10.1007/s11745-006-0990-3.
- Guo, Y. *et al.* (2007) 'Underlying mechanisms of pharmacology and toxicity of a novel PPAR agonist revealed Using rodent and canine hepatocytes', *Toxicological Sciences*, 96(2), pp. 294–309. doi: 10.1093/toxsci/kfm009.
- Haas, J. T. *et al.* (2019) 'Transcriptional network analysis implicates altered hepatic immune function in NASH development and resolution', *Nature Metabolism*, 1(6), pp. 604–614. doi: 10.1038/s42255-019-0076-1.
- Haas, J. T., Francque, S. and Staels, B. (2016) 'Pathophysiology and Mechanisms of Nonalcoholic Fatty Liver Disease', *Annual Review of Physiology*. doi: 10.1146/annurev-physiol-021115-105331.
- Han, H. S. *et al.* (2016) 'Regulation of glucose metabolism from a liver-centric perspective', *Experimental and Molecular Medicine*. Nature Publishing Group, 48(3), pp. e218-10. doi: 10.1038/emm.2015.122.
- Heeren, J. and Scheja, L. (2021) 'Metabolic-associated fatty liver disease and lipoprotein metabolism', *Molecular Metabolism*. Elsevier GmbH, 50(April), p. 101238. doi: 10.1016/j.molmet.2021.101238.
- Van Herck, M. A., Vonghia, L. and Francque, S. M. (2017) 'Animal models of nonalcoholic fatty liver disease—a starter's guide', *Nutrients*, 9(10), pp. 1–13. doi: 10.3390/nu9101072.
- Hertz, R., Bishara-Shieban, J. and Bar-Tana, J. (1995) 'Mode of action of peroxisome proliferators as hypolipidemic drugs. Suppression of apolipoprotein C-III', *Journal of Biological Chemistry*. © 1995 ASBMB. Currently published by Elsevier Inc; originally published by American Society for Biochemistry and Molecular Biology., 270(22), pp. 13470–13475. doi: 10.1074/jbc.270.22.13470.
- Hinds, T. D. *et al.* (2017) 'Mice with hyperbilirubinemia due to Gilbert's syndrome polymorphism are resistant to hepatic steatosis by decreased serine 73 phosphorylation of PPAR α ', *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 312(4), pp. E244–E252. doi: 10.1152/ajpendo.00396.2016.
- Hipp, M. S. *et al.* (2004) 'NEDD8 Ultimate Buster-1L Interacts with the Ubiquitin-like Protein FAT10 and Accelerates Its Degradation', *Journal of Biological Chemistry*. © 2004 ASBMB. Currently published by Elsevier Inc; originally published by American Society for Biochemistry and Molecular Biology., 279(16), pp. 16503–16510. doi: 10.1074/jbc.M310114200.
- Hipp, M. S. *et al.* (2005) 'FAT10, a Ubiquitin-Independent Signal for Proteasomal Degradation', *Molecular and Cellular Biology*, 25(9), pp. 3483–3491. doi: 10.1128/mcb.25.9.3483-3491.2005.
- Hirsova, P. and Gores, G. J. (2015) 'Ballooned hepatocytes, undead cells, sonic hedgehog and vitamin E: therapeutic implications for NASH', *Hepatology*, 61(1), pp. 15–17. doi: 10.1002/hep.27279.BALLOONED.
- Hochstrasser, M. (2009) 'Origin and Function of Ubiquitin-like Conjugation', *Nature*, 458(7237), p. 422. doi: 10.1038/nature07958.Origin.
- Honda, Y. *et al.* (2017) 'Pemafibrate, a novel selective peroxisome proliferator-activated receptor alpha modulator, improves the pathogenesis in a rodent model of nonalcoholic steatohepatitis', *Scientific Reports*, 7(February), pp. 1–11. doi: 10.1038/srep42477.
- Horie, T. *et al.* (2010) 'MicroRNA-33 encoded by an intron of sterol regulatory element-binding protein 2 (Srebp2) regulates HDL in vivo', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(40), pp. 17321–17326. doi: 10.1073/pnas.1008499107.
- Horton, J. D., Goldstein, J. L. and Brown, M. S. (2002) 'SREBPs: Activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver', *Journal of Clinical Investigation*, 109(9), pp. 1125–1131. doi: 10.1172/JCI0215593.
- Hui, J. M. *et al.* (2004) 'Beyond insulin resistance in NASH: TNF- α or adiponectin?', *Hepatology*, 40(1), pp. 46–54. doi: 10.1002/hep.20280.
- Hussain, M. M. (2014) 'Intestinal Lipid Absorption and Lipoprotein Formation', *Current Opinion in Lipidology*, 23(1), pp. 1–7.

doi: 10.1097/MOL.000000000000084.Intestinal.

Iershov, A. *et al.* (2019) 'The class 3 PI3K coordinates autophagy and mitochondrial lipid catabolism by controlling nuclear receptor PPAR α ', *Nature Communications*, pp. 1–18. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-019-09598-9>.

Ip, E. *et al.* (2003) 'Central role of PPAR α -dependent hepatic lipid turnover in dietary steatohepatitis in mice', *Hepatology*, 38(1), pp. 123–132. doi: 10.1053/jhep.2003.50307.

Ip, E. *et al.* (2004) 'Administration of the Potent PPAR α Agonist, Wy-14,643, Reverses Nutritional Fibrosis and Steatohepatitis in Mice', *Hepatology*, 39(5), pp. 1286–1296. doi: 10.1002/hep.20170.

Issemann, I. and Green, S. (1990) 'Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators', *Nature*, 347. doi: 10.1016/0002-9343(78)90700-3.

Itagaki, H. *et al.* (2013) 'Morphological and functional characterization of non-alcoholic fatty liver disease induced by a methionine-choline-deficient diet in C57BL/6 mice', *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 6(12), pp. 2683–2696.

Jacobs, A. *et al.* (2016) 'An Overview of Mouse Models of Nonalcoholic Steatohepatitis: From Past to Present', *Current protocols in mouse biology*, 6(2), pp. 185–200. doi: 10.1002/cpmo.3.

Jain, M. R. *et al.* (2018) 'Dual PPAR α / γ agonist saroglitazar improves liver histopathology and biochemistry in experimental NASH models', *Liver International*, 38(6), pp. 1084–1094. doi: 10.1111/liv.13634.

Jalouli, M. *et al.* (2003) 'Sex difference in hepatic peroxisome proliferator-activated receptor α expression: Influence of pituitary and gonadal hormones', *Endocrinology*, 144(1), pp. 101–109. doi: 10.1210/en.2002-220630.

Jha, P. *et al.* (2014) 'Role of adipose tissue in methionine-choline-deficient model of non-alcoholic steatohepatitis (NASH)', *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1842(7), pp. 959–970. doi: 10.1016/j.bbadis.2014.02.012.

Jia, Y. *et al.* (2004) 'Transcription coactivator PBP, the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)-binding protein, is required for PPAR α -regulated gene expression in liver', *Journal of Biological Chemistry*. © 2004 ASBMB. Currently published by Elsevier Inc; originally published by American Society for Biochemistry and Molecular Biology., 279(23), pp. 24427–24434. doi: 10.1074/jbc.M402391200.

Jia, Y. *et al.* (2018) 'Different roles of FAT10, FOXO1, and ADRA2A in hepatocellular carcinoma tumorigenesis in patients with alcoholic steatohepatitis (ASH) vs non-alcoholic steatohepatitis (NASH)', *Experimental and Molecular Pathology*. doi: 10.1016/j.yexmp.2018.07.005.

Jin, J. *et al.* (2007) 'Dual E1 activation systems for ubiquitin differentially regulate E2 enzyme charging', *Nature*, 447(7148), pp. 1135–1138. doi: 10.1038/nature05902.

Jobbins, A. M. *et al.* (2022) 'Dysregulated RNA polyadenylation contributes to metabolic impairment in non-alcoholic fatty liver disease', *Nucleic Acids Research*, 50(6), pp. 3379–3393. doi: 10.1093/nar/gkac165.

Jonas, W. and Schürmann, A. (2021) 'Genetic and epigenetic factors determining NAFLD risk', *Molecular Metabolism*. Elsevier GmbH, 50(November 2020), p. 101111. doi: 10.1016/j.molmet.2020.101111.

Juge-Aubry, C. E. *et al.* (1999) 'Regulation of the transcriptional activity of the peroxisome proliferator-activated receptor by phosphorylation of a ligand-independent trans-activating domain', *Journal of Biological Chemistry*, 274(15), pp. 10505–10510. doi: 10.1074/jbc.274.15.10505.

Jung, T. W., Yoo, H. J. and Choi, K. M. (2016) 'Implication of hepatokines in metabolic disorders and cardiovascular diseases', *BBA Clinical*. The Authors, 5, pp. 108–113. doi: 10.1016/j.bbacli.2016.03.002.

Kalveram, B., Schmidtke, G. and Groettrup, M. (2008) 'The ubiquitin-like modifier FAT10 interacts with HDAC6 and localizes to aggresomes under proteasome inhibition', *Journal of Cell Science*. doi: 10.1242/jcs.035006.

Kawaguchi, Y. *et al.* (2003) 'The deacetylase HDAC6 regulates aggresome formation and cell viability in response to misfolded protein stress', *Cell*, 115(6), pp. 727–738. doi: 10.1016/S0092-8674(03)00939-5.

Kawasaki, M. *et al.* (2020) 'Elucidation of molecular mechanism of a selective PPAR α modulator, pemafibrate, through combinational approaches of x-ray crystallography, thermodynamic analysis, and first-principle calculations', *International Journal of Molecular Sciences*, 21(1), pp. 1–14. doi: 10.3390/ijms21010361.

Keller, H. *et al.* (1993) 'Fatty acids and retinoids control lipid metabolism through activation of peroxisome proliferator-activated receptor-retinoid X receptor heterodimers', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(6), pp. 2160–2164. doi: 10.1073/pnas.90.6.2160.

- Kersten, S. *et al.* (1999) 'Peroxisome proliferator-activated receptor α mediates the adaptive response to fasting', *Journal of Clinical Investigation*, 103(11), pp. 1489–1498. doi: 10.1172/JCI6223.
- Kim, Y. S. *et al.* (2021) 'Liver X Receptor Alpha Activation Inhibits Autophagy and Lipophagy in Hepatocytes by Dysregulating Autophagy-Related 4B Cysteine Peptidase and Rab-8B, Reducing Mitochondrial Fuel Oxidation', *Hepatology*, 73(4), pp. 1307–1326. doi: 10.1002/hep.31423.
- Kita, Y. *et al.* (2012) 'Metformin Prevents and Reverses Inflammation in a Non-Diabetic Mouse Model of Nonalcoholic Steatohepatitis', *PLoS ONE*, 7(9). doi: 10.1371/journal.pone.0043056.
- Kleemann, R. *et al.* (2003) 'Fibrates down-regulate IL-1-stimulated C-reactive protein gene expression in hepatocytes by reducing nuclear p50-NF κ B-C/EBP- β complex formation', *Blood*. American Society of Hematology, 101(2), pp. 545–551. doi: 10.1182/blood-2002-06-1762.
- Kleiner, D. E. *et al.* (2005) 'Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease', *Hepatology*, 41(6), pp. 1313–1321. doi: 10.1002/hep.20701.
- Knauf, C. *et al.* (2006) 'Peroxisome proliferator-activated receptor- α -null mice have increased white adipose tissue glucose utilization, GLUT4, and fat mass: Role in liver and brain', *Endocrinology*, 147(9), pp. 4067–4078. doi: 10.1210/en.2005-1536.
- Knight, B. L. *et al.* (2005) 'A role for PPAR α in the control of SREBP activity and lipid synthesis in the liver', *Biochemical Journal*, 389(2), pp. 413–421. doi: 10.1042/BJ20041896.
- Ko, C. W. *et al.* (2020) 'Regulation of intestinal lipid metabolism: current concepts and relevance to disease', *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*. Springer US, 17(3), pp. 169–183. doi: 10.1038/s41575-019-0250-7.
- Kobayashi, J. *et al.* (2015) 'Hepatic lipase: A comprehensive view of its role on plasma lipid and lipoprotein metabolism', *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis*, 22(10), pp. 1001–1011. doi: 10.5551/jat.31617.
- Koopman, K. E. *et al.* (2014) 'Hypercaloric diets with increased meal frequency, but not meal size, increase intrahepatic triglycerides: A randomized controlled trial', *Hepatology*, 60(2), pp. 545–553. doi: 10.1002/hep.27149.
- Krenkel, O. and Tacke, F. (2017) 'Liver macrophages in tissue homeostasis and disease', *Nature Reviews Immunology*, 17(5), pp. 306–321. doi: 10.1038/nri.2017.11.
- Kucukoglu, O. *et al.* (2014) 'High-fat diet triggers Mallory-Denk body formation through misfolding and crosslinking of excess keratin 8', *Hepatology*, 60(1), pp. 169–178. doi: 10.1002/hep.27068.
- Kumar, D. P. *et al.* (2020) 'The PPAR α/γ Agonist Saroglitazar Improves Insulin Resistance and Steatohepatitis in a Diet Induced Animal Model of Nonalcoholic Fatty Liver Disease', *Scientific Reports*, 10(1), pp. 1–14. doi: 10.1038/s41598-020-66458-z.
- Kusano, H. *et al.* (2022) 'Utility of sonic hedgehog and keratin 8/18 immunohistochemistry for detecting ballooned hepatocytes', *Histopathology*, 80(6), pp. 974–981. doi: 10.1111/his.14631.
- Lalloyer, F. *et al.* (2011) 'Peroxisome proliferator-activated receptor- α gene level differently affects lipid metabolism and inflammation in apolipoprotein E2 knock-in mice', *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 31(7), pp. 1573–1579. doi: 10.1161/ATVBAHA.110.220525.
- Larter, C. Z. *et al.* (2012) 'Peroxisome proliferator-activated receptor- α agonist, Wy 14643, improves metabolic indices, steatosis and ballooning in diabetic mice with non-alcoholic steatohepatitis', *Journal of Gastroenterology and Hepatology (Australia)*, 27(2), pp. 341–350. doi: 10.1111/j.1440-1746.2011.06939.x.
- Lassailly, G. *et al.* (2015) 'Bariatric surgery reduces features of nonalcoholic steatohepatitis in morbidly obese patients', *Gastroenterology*. Elsevier, Inc, 149(2), pp. 379–388. doi: 10.1053/j.gastro.2015.04.014.
- Lassailly, G. *et al.* (2016) 'Perspectives on Treatment for Nonalcoholic Steatohepatitis', *Gastroenterology*, 150(8), pp. 1835–1848. doi: 10.1053/j.gastro.2016.03.004.
- Latorre, J. *et al.* (2017) 'Decreased lipid metabolism but increased FA biosynthesis are coupled with changes in liver microRNAs in obese subjects with NAFLD', *International Journal of Obesity*, 41(4), pp. 620–630. doi: 10.1038/ijo.2017.21.
- Lazennec, G. *et al.* (2000) 'Activation of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) by their ligands and protein kinase A activators', *Molecular Endocrinology*, 14(12), pp. 1962–1975. doi: 10.1210/mend.14.12.0575.
- Lee, C. G. L. *et al.* (2003) 'Expression of the FAT10 gene is highly upregulated in hepatocellular carcinoma and other gastrointestinal and gynecological cancers', *Oncogene*, 22(17), pp. 2592–2603. doi: 10.1038/sj.onc.1206337.
- Lee, H. Y. *et al.* (2015) 'PPAR- α and glucocorticoid receptor synergize to promote erythroid progenitor self-renewal', *Nature*,

522(7557), pp. 474–477. doi: 10.1038/nature14326.

Lee, Y. H. *et al.* (2021) 'Hepatic MIR20B promotes nonalcoholic fatty liver disease by suppressing PPARA', *eLife*, 10, pp. 1–33. doi: 10.7554/eLife.70472.

Lefebvre, P. *et al.* (2017) 'Interspecies NASH disease activity whole-genome profiling identifies a fibrogenic role of PPAR α -regulated dermatopontin', *JCI insight*, 2(13). doi: 10.1172/jci.insight.92264.

Lefere, S. *et al.* (2020) 'Differential effects of selective- and pan-PPAR agonists on experimental steatohepatitis and hepatic macrophages', *Journal of Hepatology*, 73(4), pp. 757–770. doi: 10.1016/j.jhep.2020.04.025.

Leng, L. *et al.* (2014) 'A proteomics strategy for the identification of FAT10-modified sites by mass spectrometry', *Journal of Proteome Research*, 13(1), pp. 268–276. doi: 10.1021/pr400395k.

Leuenberger, N., Pradervand, S. and Wahli, W. (2009) 'Sumoylated PPAR α mediates sex-specific gene repression and protects the liver from estrogen-induced toxicity in mice', *Journal of Clinical Investigation*, 119(10), pp. 3138–3148. doi: 10.1172/JCI39019.

Li, H. *et al.* (2021) 'Hepatic cholesterol transport and its role in non-alcoholic fatty liver disease and atherosclerosis', *Progress in Lipid Research*, 83(March). doi: 10.1016/j.plipres.2021.101109.

Li, J. Z. *et al.* (2012) 'Chronic overexpression of PNPLA3 I148M in mouse liver causes hepatic steatosis', *Journal of Clinical Investigation*, 122(11), pp. 4130–4144. doi: 10.1172/JCI65179.

Li, P. *et al.* (2017) 'The role of Kupffer cells in hepatic diseases', *Molecular Immunology*. Elsevier Ltd, 85, pp. 222–229. doi: 10.1016/j.molimm.2017.02.018.

Li, T. *et al.* (2011) 'FAT10 modifies p53 and upregulates its transcriptional activity', *Arch Biochem Biophys*. doi: 10.1016/j.abb.2011.02.017.FAT10.

Lim, C. B., Zhang, D. and Lee, C. G. L. (2006) 'FAT10, a gene up-regulated in various cancers, is cell-cycle regulated', *Cell Division*. doi: 10.1186/1747-1028-1-20.

Lim, J. S. *et al.* (2010) 'The role of fructose in the pathogenesis of NAFLD and the metabolic syndrome', *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*. Nature Publishing Group, 7(5), pp. 251–264. doi: 10.1038/nrgastro.2010.41.

Lin, Y. *et al.* (2021) 'PAQR9 regulates hepatic ketogenesis and fatty acid oxidation during fasting by modulating protein stability of PPAR α ', *Molecular Metabolism*. Elsevier GmbH, 53(August), p. 101331. doi: 10.1016/j.molmet.2021.101331.

Liu, Hui *et al.* (2014) 'TLR3/4 signaling is mediated via the NF κ B-CXCR4/7 pathway in human alcoholic hepatitis and non-alcoholic steatohepatitis which formed Mallory-Denk bodies', *Experimental and Molecular Pathology*. doi: 10.1016/j.yexmp.2014.07.001.

Liu, H. *et al.* (2014) 'Ufmylation and FATylation pathways are downregulated in human alcoholic and nonalcoholic steatohepatitis, and mice fed DDC, where Mallory-Denk bodies (MDBs) form', *Experimental and Molecular Pathology*. doi: 10.1016/j.yexmp.2014.05.010.

Liu, X. *et al.* (2016) 'The ubiquitin-like protein FAT10 stabilizes eEF1A1 expression to promote tumor proliferation in a complex manner', *Cancer Research*, 76(16), pp. 4897–4907. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-15-3118.

Liu, X. *et al.* (2021) 'FAT10 protects against ischemia-induced ventricular arrhythmia by decreasing Nedd4-2/Nav1.5 complex formation', *Cell Death and Disease*. Springer US, 12(1). doi: 10.1038/s41419-020-03290-3.

Liu, Y. C. *et al.* (1999) 'A MHC-encoded ubiquitin-like protein (FAT10) binds noncovalently to the spindle assembly checkpoint protein MAD2', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(8), pp. 4313–4318. doi: 10.1073/pnas.96.8.4313.

Liu, Y. L. *et al.* (2014) 'TM6SF2 rs58542926 influences hepatic fibrosis progression in patients with non-alcoholic fatty liver disease', *Nature Communications*. Nature Publishing Group, 5, pp. 1–6. doi: 10.1038/ncomms5309.

Ludwig, J. *et al.* (1980) 'Non-alcoholic steatohepatitis: Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease', *Mayo Clinic proceedings*.

Luo, C. *et al.* (2018) 'GRP78 Promotes Hepatocellular Carcinoma proliferation by increasing FAT10 expression through the NF- κ B pathway', *Experimental Cell Research*. doi: 10.1016/j.yexcr.2018.02.007.

Luo, Z. *et al.* (2012) 'The Nedd8-activating enzyme inhibitor MLN4924 induces autophagy and apoptosis to suppress liver cancer cell growth', *Cancer Research*, 72(13), pp. 3360–3371. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-0388.

- Mah, M. M., Roverato, N. and Groettrup, M. (2020) 'Regulation of interferon induction by the ubiquitin- like modifier FAT10', *Biomolecules*, 10(6), pp. 1–14. doi: 10.3390/biom10060951.
- Mahdessian, H. *et al.* (2014) 'TM6SF2 is a regulator of liver fat metabolism influencing triglyceride secretion and hepatic lipid droplet content', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(24), pp. 8913–8918. doi: 10.1073/pnas.1323785111.
- Mahley, R. W. *et al.* (1984) 'Plasma lipoproteins: Apolipoprotein structure and function', *Journal of Lipid Research*. © 1984 ASBMB. Currently published by Elsevier Inc; originally published by American Society for Biochemistry and Molecular Biology., 25(12), pp. 1277–1294. doi: 10.1016/s0022-2275(20)34443-6.
- Malarkey, D. E. *et al.* (2005) 'New Insights into Functional Aspects of Liver Morphology', *Toxicologic Pathology*, 33(1), pp. 27–34. doi: 10.1080/01926230590881826.
- Mandard, S. *et al.* (2007) 'Glycogen synthase 2 is a novel target gene of peroxisome proliferator-activated receptors', *Cellular and Molecular Life Sciences*, 64(9), pp. 1145–1157. doi: 10.1007/s00018-007-7006-1.
- Mansouri, R. M. *et al.* (2008) 'Systemic and distal repercussions of liver-specific peroxisome proliferator-activated receptor- α control of the acute-phase response', *Endocrinology*, 149(6), pp. 3215–3223. doi: 10.1210/en.2007-1339.
- Marcellin, P. and Kutala, B. K. (2018) 'Liver diseases: A major, neglected global public health problem requiring urgent actions and large-scale screening', *Liver International*, 38(December 2017), pp. 2–6. doi: 10.1111/liv.13682.
- Marino, J. S. *et al.* (2016) 'Glucocorticoid receptor β induces hepatic steatosis by augmenting inflammation and inhibition of the Peroxisome Proliferator-activated Receptor (PPAR) α ', *Journal of Biological Chemistry*, 291(50), pp. 25776–25788. doi: 10.1074/jbc.M116.752311.
- Martínez-Micaelo, N. *et al.* (2016) 'Dietary fatty acid composition is sensed by the NLRP3 inflammasome: Omega-3 fatty acid (DHA) prevents NLRP3 activation in human macrophages', *Food and Function*. Royal Society of Chemistry, 7(8), pp. 3480–3487. doi: 10.1039/c6fo00477f.
- Le May, C. *et al.* (2000) 'Reduced hepatic fatty acid oxidation in fasting PPAR α null mice is due to impaired mitochondrial hydroxymethylglutaryl-CoA synthase gene expression', *FEBS Letters*, 475(3), pp. 163–166. doi: 10.1016/S0014-5793(00)01648-3.
- McPherson, S. *et al.* (2015) 'Evidence of NAFLD progression from steatosis to fibrosing-steatohepatitis using paired biopsies: Implications for prognosis and clinical management', *Journal of Hepatology*. European Association for the Study of the Liver, 62(5), pp. 1148–1155. doi: 10.1016/j.jhep.2014.11.034.
- Millar, J. S. *et al.* (2009) 'The potent and selective PPAR- α agonist LY518674 upregulates both apoA-I production and catabolism in human subjects with the metabolic syndrome', *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 29(1), pp. 140–146. doi: 10.1161/ATVBAHA.108.171223.The.
- Miura, K. *et al.* (2010) 'Toll-like receptor 9 promotes steatohepatitis by induction of interleukin-1 β in mice', *Gastroenterology*, 139(1), pp. 1–20. doi: 10.1053/j.gastro.2010.03.052.MIURA.
- Miyata, K. S. *et al.* (1998) 'Receptor-interacting protein 140 interacts with and inhibits transactivation by, peroxisome proliferator-activated receptor α and liver- X-receptor α ', *Molecular and Cellular Endocrinology*, 146(1–2), pp. 69–76. doi: 10.1016/S0303-7207(98)00196-8.
- Mizushima, N. and Komatsu, M. (2011) 'Autophagy: Renovation of cells and tissues', *Cell*. Elsevier Inc., 147(4), pp. 728–741. doi: 10.1016/j.cell.2011.10.026.
- Montagner, A. *et al.* (2016) 'Liver PPAR α is crucial for whole-body fatty acid homeostasis and is protective against NAFLD', *Gut*, 65(7), pp. 1202–1214. doi: 10.1136/gutjnl-2015-310798.
- Motojima, K. *et al.* (1998) 'Expression of putative fatty acid transporter genes are regulated by peroxisome proliferator-activated receptor α and γ activators in a tissue- and inducer-specific manner', *Journal of Biological Chemistry*. © 1998 ASBMB. Currently published by Elsevier Inc; originally published by American Society for Biochemistry and Molecular Biology., 273(27), pp. 16710–16714. doi: 10.1074/jbc.273.27.16710.
- Murphy, S. K. *et al.* (2013) 'Relationship Between the Methylome and Transcriptome in Patients with Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: (Functional methylation in NAFLD)', *Gastroenterology*, 145(5), pp. 1076–1087. doi: 10.1053/j.gastro.2013.07.047.Relationship.
- Myeku, N. and Figueiredo-Pereira, M. E. (2011) 'Dynamics of the degradation of ubiquitinated proteins by proteasomes and autophagy: Association with sequestosome 1/p62', *Journal of Biological Chemistry*, 286(25), pp. 22426–22440. doi: 10.1074/jbc.M110.149252.

- Nagasawa, T. *et al.* (2006) 'Effects of bezafibrate, PPAR pan-agonist, and GW501516, PPAR δ agonist, on development of steatohepatitis in mice fed a methionine- and choline-deficient diet', *European Journal of Pharmacology*, 536(1–2), pp. 182–191. doi: 10.1016/j.ejphar.2006.02.028.
- Nagashima, Y. *et al.* (2011) 'FAT10 protein binds to polyglutamine proteins and modulates their solubility', *Journal of Biological Chemistry*, 286(34), pp. 29594–29600. doi: 10.1074/jbc.M111.261032.
- Nakajima, A. *et al.* (2021) 'Randomised clinical trial: Pemaafibrate, a novel selective peroxisome proliferator-activated receptor α modulator (SPPARM α), versus placebo in patients with non-alcoholic fatty liver disease', *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 54(10), pp. 1263–1277. doi: 10.1111/apt.16596.
- Naureen Memon, Barry I Weinberger, Thomas Hegyi, and L. M. A. (2016) 'Inherited Disorders of Bilirubin Clearance', *Pediatric research*, 72(23), pp. 2964–2979. doi: 10.1038/pr.2015.247.Inherited.
- Nawrot, M. *et al.* (2021) 'Intestine-liver crosstalk in Type 2 Diabetes and non-alcoholic fatty liver disease', *Metabolism: Clinical and Experimental*, 123. doi: 10.1016/j.metabol.2021.154844.
- Nguyen, N. T. H. *et al.* (2016) 'Ubiquitin-like modifier FAT10 attenuates RIG-I mediated antiviral signaling by segregating activated RIG-I from its signaling platform', *Scientific Reports*. Nature Publishing Group, 6(October 2015), pp. 1–12. doi: 10.1038/srep23377.
- Nguyen, P. *et al.* (2008) 'Liver lipid metabolism', *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 92(3), pp. 272–283. doi: 10.1111/j.1439-0396.2007.00752.x.
- Nikam, A. *et al.* (2018) 'The PPAR α Agonist Fenofibrate Prevents Formation of Protein Aggregates (Mallory-Denk bodies) in a Murine Model of Steatohepatitis-like Hepatotoxicity', *Scientific Reports*, 8(1), pp. 1–14. doi: 10.1038/s41598-018-31389-3.
- Nuciforo, S. and Heim, M. H. (2021) 'Organoids to model liver disease', *JHEP Reports*. Elsevier B.V, 3(1), p. 100198. doi: 10.1016/j.jhepr.2020.100198.
- Oberkofler, H. *et al.* (2002) 'Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) γ coactivator-1 recruitment regulates PPAR subtype specificity', *Journal of Biological Chemistry*. © 2002 ASBMB. Currently published by Elsevier Inc; originally published by American Society for Biochemistry and Molecular Biology., 277(19), pp. 16750–16757. doi: 10.1074/jbc.M200475200.
- Ohsumi, Y. (2014) 'Historical landmarks of autophagy research', *Cell Research*. Nature Publishing Group, 24(1), pp. 9–23. doi: 10.1038/cr.2013.169.
- Okishio, S. *et al.* (2020) 'PPAR α agonist and metformin co-treatment ameliorates NASH in mice induced by a choline-deficient, amino acid-defined diet with 45% fat', *Scientific Reports*. Nature Publishing Group UK, 10(1), pp. 1–11. doi: 10.1038/s41598-020-75805-z.
- Oliva, J. *et al.* (2008) 'Fat10 is an epigenic marker for liver preneoplasia in a drug-primed mouse model of tumorigenesis', *Experimental and Molecular Pathology*, 84(2), pp. 102–112. doi: 10.1016/j.yexmp.2007.12.003.FAT10.
- Oliva, Joan *et al.* (2010) 'Independent phenotype of binuclear hepatocytes and cellular localization of UbD', *Experimental and Molecular Pathology*. Elsevier B.V., 89(2), pp. 103–108. doi: 10.1016/j.yexmp.2010.06.006.
- Oliva, J. *et al.* (2010) 'The role of cytokines in UbD promoter regulation and Mallory-Denk body-like aggresomes', *Experimental and Molecular Pathology*, 89(1), pp. 1–8. doi: 10.1016/j.yexmp.2010.04.001.
- Oscarsson, J. *et al.* (2018) 'Effects of free omega-3 carboxylic acids and fenofibrate on liver fat content in patients with hypertriglyceridemia and non-alcoholic fatty liver disease: A double-blind, randomized, placebo-controlled study', *Journal of Clinical Lipidology*, 12(6), pp. 1390–1403.e4. doi: 10.1016/j.jacl.2018.08.003.
- Ouimet, M., Barrett, T. J. and Fisher, E. A. (2019) 'HDL and reverse cholesterol transport: Basic mechanisms and their roles in vascular health and disease', *Circulation Research*, 124(10), pp. 1505–1518. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.119.312617.
- Ozben, T. and Ozben, S. (2019) 'Neuro-inflammation and anti-inflammatory treatment options for Alzheimer's disease', 72(April), pp. 87–89.
- Pais, R. *et al.* (2013) 'A systematic review of follow-up biopsies reveals disease progression in patients with non-alcoholic fatty liver', *Journal of Hepatology*. European Association for the Study of the Liver, 59(3), pp. 550–556. doi: 10.1016/j.jhep.2013.04.027.
- Pankiv, S. *et al.* (2007) 'p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy*[S]', *Journal of Biological Chemistry*, 282(33), pp. 24131–24145. doi: 10.1074/jbc.M702824200.
- Papatheodoridi, M. and Cholongitas, E. (2019) 'Diagnosis of Non-alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD): Current Concepts',

- Current Pharmaceutical Design*, 24(38), pp. 4574–4586. doi: 10.2174/1381612825666190117102111.
- Paris, J. and Henderson, N. C. (2022) 'Liver zonation, revisited', *Hepatology*, (February), pp. 1–12. doi: 10.1002/hep.32408.
- Park, H. W. *et al.* (2014) 'Pharmacological correction of obesity-induced autophagy arrest using calcium channel blockers', *Nature Communications*. Nature Publishing Group, 5, pp. 1–12. doi: 10.1038/ncomms5834.
- Patsouris, D. *et al.* (2004) 'PPAR α governs glycerol metabolism', *Journal of Clinical Investigation*, 114(1), pp. 94–103. doi: 10.1172/JCI200420468.
- Paulusma, C. C. *et al.* (2022) 'Amino acid metabolism, transport and signalling in the liver revisited', *Biochemical Pharmacology*. Elsevier Inc., 201(April), p. 115074. doi: 10.1016/j.bcp.2022.115074.
- Paumelle, R. *et al.* (2006) 'Acute antiinflammatory properties of statins involve peroxisome proliferator-activated receptor- α via inhibition of the protein kinase C signaling pathway', *Circulation Research*, 98(3), pp. 361–369. doi: 10.1161/01.RES.0000202706.70992.95.
- Paumelle, R. *et al.* (2019) 'Hepatic PPAR α is critical in the metabolic adaptation to sepsis', *Journal of Hepatology*, 70(5), pp. 963–973. doi: 10.1016/j.jhep.2018.12.037.
- Pawella, L. M. *et al.* (2014) 'Perilipin discerns chronic from acute hepatocellular steatosis', *Journal of Hepatology*. European Association for the Study of the Liver, 60(3), pp. 633–642. doi: 10.1016/j.jhep.2013.11.007.
- Pawlak, M. *et al.* (2014) 'The transrepressive activity of peroxisome proliferator-activated receptor alpha is necessary and sufficient to prevent liver fibrosis in mice', *Hepatology*, 60(5), pp. 1593–1606. doi: 10.1002/hep.27297.
- Perissi, V. *et al.* (2004) 'A Corepressor/Coactivator Exchange Complex Required for Transcriptional Activation by Nuclear Receptors and Other Regulated Transcription Factors', *Cell*, 116(4), pp. 511–526. doi: 10.1016/S0092-8674(04)00133-3.
- Pettersen, I. K. N. *et al.* (2019) 'Upregulated PDK4 expression is a sensitive marker of increased fatty acid oxidation', *Mitochondrion*, 49(July), pp. 97–110. doi: 10.1016/j.mito.2019.07.009.
- Pineda-Torra, I. *et al.* (2002) 'Characterization of the Human PPAR alpha Promoter : Identification of a Functional Nuclear Response Element', *Molecular Endocrinology*, 16(5), pp. 1013–1028.
- Pineda-Torra, I. *et al.* (2003) 'Bile acids induce the expression of the human peroxisome proliferator-activated receptor α gene via activation of the farnesoid X receptor', *Molecular Endocrinology*, 17(2), pp. 259–272. doi: 10.1210/me.2002-0120.
- Pirola, C. J. *et al.* (2015) 'Circulating microRNA signature in non-alcoholic fatty liver disease: from serum non-coding RNAs to liver histology and disease pathogenesis', *Gut*, 64(5), pp. 1–25. doi: 10.1002/9781119963714.ch1.
- Polizzi, A. *et al.* (2016) 'Hepatic fasting-induced PPAR α activity does not depend on essential fatty acids', *International Journal of Molecular Sciences*, 17(10). doi: 10.3390/ijms17101624.
- Pourcet, B. *et al.* (2010) 'SUMOylation of human peroxisome proliferator-activated receptor α inhibits its trans-activity through the recruitment of the nuclear corepressor NCoR', *Journal of Biological Chemistry*. doi: 10.1074/jbc.M109.078311.
- Promrat, K. *et al.* (2010) 'Randomized controlled trial testing the effects of weight loss on nonalcoholic steatohepatitis', *Hepatology*, 51(1), pp. 121–129. doi: 10.1002/hep.23276.
- Puche, J. E., Saiman, Y. and Friedman, S. L. (2013) 'Hepatic stellate cells and liver fibrosis', *Comprehensive Physiology*, 3(4), pp. 1473–1492. doi: 10.1002/cphy.c120035.
- Puri, P. and Sanyal, A. J. (2012) 'Nonalcoholic fatty liver disease: Definitions, risk factors, and workup', *Clinical Liver Disease*, 1(4), pp. 99–103. doi: 10.1002/cld.81.
- Qing, X. *et al.* (2011) 'Increased expression of FAT10 in colon benign, premalignant and malignant epithelial neoplasms', *Experimental and Molecular Pathology*, 90(1), pp. 51–54. doi: 10.1016/j.yexmp.2010.09.005.
- Quiroga, A. D. and Lehner, R. (2012) 'Liver triacylglycerol lipases', *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1821(5), pp. 762–769. doi: 10.1016/j.bbalip.2011.09.007.
- Raasi, S. *et al.* (1999) 'A ubiquitin-like protein which is synergistically inducible by interferon- γ and tumor necrosis factor- α ', *European Journal of Immunology*, 29(12), pp. 4030–4036. doi: 10.1002/(SICI)1521-4141(199912)29:12<4030::AID-IMMU4030>3.0.CO;2-Y.
- Raasi, S., Schmidtke, G. and Groettrup, M. (2001) 'The Ubiquitin-like Protein FAT10 Forms Covalent Conjugates and Induces Apoptosis', *Journal of Biological Chemistry*, 276(38), pp. 35334–35343. doi: 10.1074/jbc.M105139200.

- Radhakrishnan, A. *et al.* (2008) 'Switch-like Control of SREBP-2 Transport Triggered by Small Changes in ER Cholesterol: A Delicate Balance', *Cell Metabolism*. Elsevier Inc., 8(6), pp. 512–521. doi: 10.1016/j.cmet.2008.10.008.
- Rajak, S. *et al.* (2021) 'Environmental Toxicants and NAFLD: A Neglected yet Significant Relationship', *Digestive Diseases and Sciences*. Springer US, (0123456789). doi: 10.1007/s10620-021-07203-y.
- Rakhshandehroo, M. *et al.* (2007) 'Comprehensive analysis of PPAR α -dependent regulation of hepatic lipid metabolism by expression profiling', *PPAR Research*, 2007. doi: 10.1155/2007/26839.
- Rakhshandehroo, M. *et al.* (2009) 'Comparative analysis of gene regulation by the transcription factor PPAR α between mouse and human', *PLoS ONE*, 4(8). doi: 10.1371/journal.pone.0006796.
- Rakhshandehroo, M. *et al.* (2010) 'Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Alpha Target Genes', 2010. doi: 10.1155/2010/612089.
- Rani, N. *et al.* (2012) 'FAT10 and NUB1L bind to the VWA domain of Rpn10 and Rpn1 to enable proteasome-mediated proteolysis', *Nature Communications*. Nature Publishing Group, 3, pp. 711–749. doi: 10.1038/ncomms1752.
- Rappaport AM, Borowy ZJ, Loughed WM, L. W. (1954) 'Subdivision of hexagonal liver lobules into a structural and functional unit; role in hepatic physiology and pathology', *The anatomical record*, pp. 11–33.
- Ratziu, V. *et al.* (2016a) 'Elafibranor, an Agonist of the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- α and - δ , Induces Resolution of Nonalcoholic Steatohepatitis Without Fibrosis Worsening', *Gastroenterology*, 150(5), pp. 1147-1159.e5. doi: 10.1053/j.gastro.2016.01.038.
- Ratziu, V. *et al.* (2016b) 'Elafibranor, an Agonist of the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- α and - δ , Induces Resolution of Nonalcoholic Steatohepatitis Without Fibrosis Worsening', *Gastroenterology*, 150(5), pp. 1147-1159.e5. doi: 10.1053/j.gastro.2016.01.038.
- Ratziu, V. *et al.* (2020) 'Cenicriviroc Treatment for Adults With Nonalcoholic Steatohepatitis and Fibrosis: Final Analysis of the Phase 2b CENTAUR Study', *Hepatology*, 72(3), pp. 892–905. doi: 10.1002/hep.31108.
- Ratziu, V. *et al.* (2021) 'Aramchol in patients with nonalcoholic steatohepatitis: a randomized, double-blind, placebo-controlled phase 2b trial', *Nature Medicine*, 27(10), pp. 1825–1835. doi: 10.1038/s41591-021-01495-3.
- Régnier, M. *et al.* (2018) 'Insights into the role of hepatocyte PPAR α activity in response to fasting', *Molecular and Cellular Endocrinology*, 471, pp. 75–88. doi: 10.1016/j.mce.2017.07.035.
- Régnier, M. *et al.* (2020) 'Hepatocyte-specific deletion of Ppara promotes NAFLD in the context of obesity', *Scientific Reports*, 10(1), pp. 1–15. doi: 10.1038/s41598-020-63579-3.
- Ren, J. *et al.* (2006) 'FAT10 plays a role in the regulation of chromosomal stability', *Journal of Biological Chemistry*, 281(16), pp. 11413–11421. doi: 10.1074/jbc.M507218200.
- Reznik, N. *et al.* (2019) 'Phenotypic Screen Identifies JAK2 as a Major Regulator of FAT10 Expression', *ACS Chemical Biology*, 14(12), pp. 2538–2545. doi: 10.1021/acscchembio.9b00667.
- Ricchi, M. *et al.* (2009) 'Differential effect of oleic and palmitic acid on lipid accumulation and apoptosis in cultured hepatocytes', *Journal of Gastroenterology and Hepatology (Australia)*, 24(5), pp. 830–840. doi: 10.1111/j.1440-1746.2008.05733.x.
- Romeo, S. *et al.* (2008) 'Genetic variation in PNPLA3 confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease', *Nature Genetics*, 40(12), pp. 1461–1465. doi: 10.1038/ng.257.
- Romero-Gómez, M., Zelber-Sagi, S. and Trenell, M. (2017) 'Treatment of NAFLD with diet, physical activity and exercise', *Journal of Hepatology*, 67(4), pp. 829–846. doi: 10.1016/j.jhep.2017.05.016.
- Rommelaere, S. *et al.* (2013) 'PPARalpha regulates the production of serum Vanin-1 by liver', *FEBS Letters*, 587(22), pp. 3742–3748. doi: 10.1016/j.febslet.2013.09.046.
- Ross, M. J. *et al.* (2006) 'Role of ubiquitin-like protein FAT10 in epithelial apoptosis in renal disease', *Journal of the American Society of Nephrology*, 17(4), pp. 996–1004. doi: 10.1681/ASN.2005070692.
- Rotonya M. Carr, and R. S. A. (2016) 'Pathophysiology of lipid droplet proteins in liver diseases', *Experimental Cell Research*, 176(12), pp. 139–148. doi: 10.1016/j.yexcr.2015.10.021.Pathophysiology.
- Roverato, N. D. *et al.* (2021) 'Parkin is an E3 ligase for the ubiquitin-like modifier FAT10, which inhibits Parkin activation and mitophagy', *Cell Reports*. Elsevier Company., 34(11), p. 108857. doi: 10.1016/j.celrep.2021.108857.

- Rui, L. (2014) 'Energy Metabolism in the Liver', *Comprehensive Physiology*, 176(5), pp. 139–148. doi: 10.1002/cphy.c130024.Energy.
- Saito, T. *et al.* (2019) 'Autophagy regulates lipid metabolism through selective turnover of NCoR1', *Nature Communications*. Springer US, 10(1). doi: 10.1038/s41467-019-08829-3.
- Sanches, S. C. L. *et al.* (2015) 'Nonalcoholic Steatohepatitis: A Search for Factual Animal Models', *BioMed Research International*. Hindawi Publishing Corporation, 2015. doi: 10.1155/2015/574832.
- Santhekadur, P. K., Kumar, D. P. and Sanyal, A. J. (2018) 'Preclinical models of non-alcoholic fatty liver disease', *Journal of Hepatology*, 68(2), pp. 230–237. doi: 10.1016/j.jhep.2017.10.031.
- Sasaki, Y. *et al.* (2019) 'Gene expression profiles induced by a novel selective peroxisome proliferator-activated receptor α modulator (SPPARMA) pemafibrate', *International Journal of Molecular Sciences*, 20(22). doi: 10.3390/ijms20225682.
- Schelpel, J. *et al.* (2016) 'Structure of UBE2Z enzyme provides functional insight into specificity in the FAT10 protein conjugation machinery', *Journal of Biological Chemistry*, 291(2), pp. 630–639. doi: 10.1074/jbc.M115.671545.
- Schmidt, V. *et al.* (2022) 'Obesity-Mediated Immune Modulation : One Step Forward , (Th) 2 Steps Back', 13(June), pp. 1–19. doi: 10.3389/fimmu.2022.932893.
- Schmidtke, G. *et al.* (2017) 'The 20S immunoproteasome and constitutive proteasome bind with the same affinity to PA28 $\alpha\beta$ and equally degrade FAT10', *Molecular Immunology*. Elsevier, (August), pp. 0–1. doi: 10.1016/j.molimm.2017.11.030.
- Schmidtke, G., Aichem, A. and Groettrup, M. (2014) 'FAT10ylation as a signal for proteasomal degradation', *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*. doi: 10.1016/j.bbamcr.2013.01.009.
- Schmidtke, G., Kalveram, B. and Groettrup, M. (2009) 'Degradation of FAT10 by the 26S proteasome is independent of ubiquitylation but relies on NUB1L', *FEBS Letters*. Federation of European Biochemical Societies, 583(3), pp. 591–594. doi: 10.1016/j.febslet.2009.01.006.
- Schneider, J. L., Suh, Y. and Cuervo, A. M. (2014) 'Deficient chaperone-mediated autophagy in liver leads to metabolic dysregulation', *Cell Metabolism*, 23(1), pp. 1–7. doi: 10.1016/j.cmet.2014.06.009.Deficient.
- Schregle, R. *et al.* (2018) 'The expression profile of the ubiquitin-like modifier FAT10 in immune cells suggests cell type-specific functions', *Immunogenetics*. Immunogenetics, 70(7), pp. 429–438. doi: 10.1007/s00251-018-1055-5.
- Schultze, A. E. *et al.* (2005) 'Administration of a PPAR α agonist increases serum apolipoprotein A-V levels and the apolipoprotein A-V/apolipoprotein C-III ratio', *Journal of Lipid Research*. © 2005 ASBMB. Currently published by Elsevier Inc; originally published by American Society for Biochemistry and Molecular Biology., 46(8), pp. 1591–1595. doi: 10.1194/jlr.C500010-JLR200.
- Schuster, S. *et al.* (2018) 'Triggering and resolution of inflammation in NASH', *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*. Springer US. doi: 10.1038/s41575-018-0009-6.
- Schwarz, J. M. *et al.* (2015) 'Effect of a high-fructose weight-maintaining diet on lipogenesis and liver fat', *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 100(6), pp. 2434–2442. doi: 10.1210/jc.2014-3678.
- Schyschka, L. *et al.* (2013) 'Hepatic 3D cultures but not 2D cultures preserve specific transporter activity for acetaminophen-induced hepatotoxicity', *Archives of Toxicology*, 87(8), pp. 1581–1593. doi: 10.1007/s00204-013-1080-y.
- Sengupta, S. *et al.* (2010) 'MTORC1 controls fasting-induced ketogenesis and its modulation by ageing', *Nature*. Nature Publishing Group, 468(7327), pp. 1100–1106. doi: 10.1038/nature09584.
- Shambaugh, G. E. (1977) 'Urea biosynthesis I. The urea cycle and relationship to the citric acid cycle', (February), pp. 2083–2087.
- Shimada, T. *et al.* (2012) 'Flavangenol (pine bark extract) and its major component procyanidin B1 enhance fatty acid oxidation in fat-loaded models', *European Journal of Pharmacology*. Elsevier B.V., 677(1–3), pp. 147–153. doi: 10.1016/j.ejphar.2011.12.034.
- Shindou, H. *et al.* (2009) 'Recent progress on acyl CoA: Lysophospholipid acyltransferase research', *Journal of Lipid Research*, 50(SUPPL.), pp. 46–51. doi: 10.1194/jlr.R800035-JLR200.
- Shiri-Sverdlov, R. *et al.* (2006) 'Early diet-induced non-alcoholic steatohepatitis in APOE2 knock-in mice and its prevention by fibrates', *Journal of Hepatology*, 44(4), pp. 732–741. doi: 10.1016/j.jhep.2005.10.033.
- Singh, R. *et al.* (2009) 'Autophagy regulates lipid metabolism', *Nature*, 458(7242), pp. 1131–1135. doi:

10.1038/nature07976.Autophagy.

Smagris, E. *et al.* (2015) 'Pnpla3^{148M} knockin mice accumulate PNPLA3 on lipid droplets and develop hepatic steatosis', *Hepatology*, 61(1), pp. 108–118. doi: 10.1002/hep.27242.

Smati, S. *et al.* (2020) 'Regulation of hepatokine gene expression in response to fasting and feeding: Influence of PPAR- α and insulin-dependent signalling in hepatocytes', *Diabetes and Metabolism*, 46(2), pp. 129–136. doi: 10.1016/j.diabet.2019.05.005.

Smati, S. *et al.* (2022) 'Integrative study of diet-induced mouse models of NAFLD identifies PPAR α as a sexually dimorphic drug target', *Gut*, 71(4), pp. 807–821. doi: 10.1136/gutjnl-2020-323323.

Snyder, A. *et al.* (2009) 'FAT10: a Novel Mediator of Vpr-Induced Apoptosis in Human Immunodeficiency Virus-Associated Nephropathy', *Journal of Virology*, 83(22), pp. 11983–11988. doi: 10.1128/jvi.00034-09.

Spann, N. J. *et al.* (2006) 'Coordinate transcriptional repression of liver fatty acid-binding protein and microsomal triglyceride transfer protein blocks hepatic very low density lipoprotein secretion without hepatosteatosis', *Journal of Biological Chemistry*. © 2006 ASBMB. Currently published by Elsevier Inc; originally published by American Society for Biochemistry and Molecular Biology., 281(44), pp. 33066–33077. doi: 10.1074/jbc.M607148200.

Spinnenhirn, V. *et al.* (2014) 'The ubiquitin-like modifier FAT10 decorates autophagy-targeted Salmonella and contributes to Salmonella resistance in mice', *Journal of Cell Science*, 127(22), pp. 4883–4893. doi: 10.1242/jcs.152371.

Staels, B. *et al.* (1998) 'Mechanism of action of fibrates on lipid and lipoprotein metabolism', *Circulation*, 98(19), pp. 2088–2093. doi: 10.1161/01.CIR.98.19.2088.

Staels, B. *et al.* (2013) 'Hepatoprotective effects of the dual peroxisome proliferator-activated receptor α /delta agonist, GFT505, in rodent models of nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis', *Hepatology*, 58(6), pp. 1941–1952. doi: 10.1002/hep.26461.

Staels, B., Maes, M. and Zambon, A. (2008) 'Fibrates and future PPAR α agonists in the treatment of cardiovascular disease', *Nature Clinical Practice Cardiovascular Medicine*, 5(9), pp. 542–553. doi: 10.1038/ncpcardio1278.

Stienstra, R. *et al.* (2007) 'The Interleukin-1 receptor antagonist is a direct target gene of PPAR α in liver', *Journal of Hepatology*, 46(5), pp. 869–877. doi: 10.1016/j.jhep.2006.11.019.

Straub, B. K. *et al.* (2008) 'Differential pattern of lipid droplet-associated proteins and de novo perilipin expression in hepatocyte steatogenesis', *Hepatology*, 47(6), pp. 1936–1946. doi: 10.1002/hep.22268.

Sumanasekera, W. K., Tien, E. S., Turpey, R., *et al.* (2003) 'Evidence that peroxisome proliferator-activated receptor α is complexed with the 90-kDa heat shock protein and the hepatitis virus B X-associated protein 2', *Journal of Biological Chemistry*, 278(7), pp. 4467–4473. doi: 10.1074/jbc.M211261200.

Sumanasekera, W. K., Tien, E. S., Davis, J. W., *et al.* (2003) 'Heat shock protein-90 (Hsp90) acts as a repressor of peroxisome proliferator-activated receptor- α (PPAR α) and PPAR β activity', *Biochemistry*, 42(36), pp. 10726–10735. doi: 10.1021/bi0347353.

Sun, G. H. *et al.* (2014) 'Increased FAT10 expression is related to poor prognosis in pancreatic ductal adenocarcinoma', *Tumor Biology*, 35(6), pp. 5167–5171. doi: 10.1007/s13277-014-1670-1.

Sun M, K. T. (2015) 'Reversibility of liver fibrosis', *Clinical research hepatology and gastroenterology*, 72(23), pp. 2964–2979. doi: 10.1016/j.clinre.2015.06.015.Reversibility.

Sun, Z. *et al.* (2012) 'Hepatic Hdac3 promotes gluconeogenesis by repressing lipid synthesis and sequestration', *Nature Medicine*, 17(3), pp. 139–148. doi: 10.1038/nm.2744.Hepatic.

Surapureddi, S. *et al.* (2002) 'Identification of a transcriptionally active peroxisome proliferator-activated receptor α -interacting cofactor complex in rat liver and characterization of PRIC285 as a coactivator', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(18), pp. 11836–11841. doi: 10.1073/pnas.182426699.

Takei, K. *et al.* (2017) 'Selective peroxisome proliferator-activated receptor- α modulator K-877 efficiently activates the peroxisome proliferator-activated receptor- α pathway and improves lipid metabolism in mice', *Journal of Diabetes Investigation*, 8(4), pp. 446–452. doi: 10.1111/jdi.12621.

Tang, C. *et al.* (2003) 'Regulation of human Δ -6 desaturase gene transcription: Identification of a functional direct repeat-1 element', *Journal of Lipid Research*. © 2003 ASBMB. Currently published by Elsevier Inc; originally published by American Society for Biochemistry and Molecular Biology., 44(4), pp. 686–695. doi: 10.1194/jlr.M200195-JLR200.

Theng, S. S. *et al.* (2014) 'Disruption of FAT10-MAD2 binding inhibits tumor progression', *Proceedings of the National*

- Academy of Sciences of the United States of America*, 111(49), pp. E5282–E5291. doi: 10.1073/pnas.1403383111.
- Thomas, M. *et al.* (2015) 'The truncated splice variant of peroxisome proliferator-activated receptor alpha, PPAR α -tr, autonomously regulates proliferative and pro-inflammatory genes', *BMC Cancer*. BMC Cancer, 15(1), pp. 1–15. doi: 10.1186/s12885-015-1500-x.
- Tilg, H. and Hotamisligil, G. S. (2006) 'Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Cytokine-Adipokine Interplay and Regulation of Insulin Resistance', *Gastroenterology*, 131(3), pp. 934–945. doi: 10.1053/j.gastro.2006.05.054.
- Trovato, F. M. *et al.* (2015) 'Mediterranean diet and non-alcoholic fatty liver disease. The need of extended and comprehensive interventions', *Clinical Nutrition*. Elsevier Ltd, 34(1), pp. 86–88. doi: 10.1016/j.clnu.2014.01.018.
- Tsuchida, T. and Friedman, S. L. (2017) 'Mechanisms of hepatic stellate cell activation', *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*. Nature Publishing Group, 14(7), pp. 397–411. doi: 10.1038/nrgastro.2017.38.
- Tsukamoto, T. *et al.* (2010) 'Vaticanol C, a resveratrol tetramer, activates PPAR and PPAR β/δ in vitro and in vivo', *Nutrition and Metabolism*, 7, pp. 1–8. doi: 10.1186/1743-7075-7-46.
- Unsal, V., Cicek, M. and Sabancilar, İ. (2021) 'Toxicity of carbon tetrachloride, free radicals and role of antioxidants', *Reviews on Environmental Health*, 36(2), pp. 279–295. doi: 10.1515/reveh-2020-0048.
- Vandel, J., Gheeraert, C., *et al.* (2020) 'GIANT: galaxy-based tool for interactive analysis of transcriptomic data', *Scientific Reports*. Nature Publishing Group UK, 10(1), pp. 1–13. doi: 10.1038/s41598-020-76769-w.
- Vandel, J., Dubois-Chevalier, J., *et al.* (2020) 'Hepatic molecular signatures highlight the sexual dimorphism of Non-Alcoholic SteatoHepatitis (NASH)', *Hepatology*. doi: 10.1002/hep.31312.
- Vilà-Brau, A. *et al.* (2011) 'Human HMGCS2 regulates mitochondrial fatty acid oxidation and FGF21 expression in HepG2 cell line', *Journal of Biological Chemistry*, 286(23), pp. 20423–20430. doi: 10.1074/jbc.M111.235044.
- Vineeth Daniel, P. *et al.* (2021) 'NF- κ B p65 regulates hepatic lipogenesis by promoting nuclear entry of ChREBP in response to a high carbohydrate diet', *Journal of Biological Chemistry*. Elsevier B.V, 296(22), p. 100714. doi: 10.1016/j.jbc.2021.100714.
- Viswakarma, N. *et al.* (2007) 'Transcriptional regulation of Cidea, mitochondrial cell death-inducing DNA fragmentation factor α -like effector A, in mouse liver by peroxisome proliferator-activated receptor α and γ ', *Journal of Biological Chemistry*. © 2007 ASBMB. Currently published by Elsevier Inc; originally published by American Society for Biochemistry and Molecular Biology., 282(25), pp. 18613–18624. doi: 10.1074/jbc.M701983200.
- Wan, R. *et al.* (2021) 'Ubiquitin-like protein FAT10 suppresses SIRT1-mediated autophagy to protect against ischemic myocardial injury', *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. Elsevier Ltd, 153, pp. 1–13. doi: 10.1016/j.yjmcc.2020.11.007.
- Wanders, R. J. A., Waterham, H. R. and Ferdinandusse, S. (2016) 'Metabolic interplay between peroxisomes and other subcellular organelles including mitochondria and the endoplasmic reticulum', *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 3(JAN), pp. 1–15. doi: 10.3389/fcell.2015.00083.
- Wang, G. *et al.* (2019) 'Attenuation of the Innate Immune Response against Viral Infection Due to ZNF598-Promoted Binding of FAT10 to RIG-I', *Cell Reports*. Elsevier Company., 28(8), pp. 1961-1970.e4. doi: 10.1016/j.celrep.2019.07.081.
- Wang, Z. *et al.* (2006) 'Co-culture with fat cells induces cellular insulin resistance in primary hepatocytes', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 345(3), pp. 976–983. doi: 10.1016/j.bbrc.2006.04.173.
- Wieckowska, A. *et al.* (2008) 'Increased hepatic and circulating interleukin-6 levels in human nonalcoholic steatohepatitis', *American Journal of Gastroenterology*, 103(6), pp. 1372–1379. doi: 10.1111/j.1572-0241.2007.01774.x.
- Wisse, F. B. and E. (2002) 'Structural and functional aspects of liver sinusoidal endothelial cell fenestrae: a review', *Comparative hepatology*, 12(1), pp. 51–56. doi: 10.1007/s11605-007-0340-7.
- Wu, P., Peters, J. M. and Harris, R. A. (2001) 'Adaptive increase in pyruvate dehydrogenase kinase 4 during starvation is mediated by peroxisome proliferator-activated receptor α ', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 287(2), pp. 391–396. doi: 10.1006/bbrc.2001.5608.
- Xiaogang Peng, Jianghua Shao, Yang Shen, Yunguo Zhou, Qing Cao, Jinzhu Hu, Wenfeng He, Xin Yu, Xiuxia Liu, A. J. M. and K. H. (2013) 'FAT10 Protects Cardiac Myocytes Against Apoptosis', *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 59. doi: 10.1016/j.yjmcc.2013.01.018.FAT10.
- Yaacob, N. S. *et al.* (2001) 'The transcription of the peroxisome proliferator-activated receptor α gene is regulated by protein kinase C', *Toxicology Letters*, 125(1–3), pp. 133–141. doi: 10.1016/S0378-4274(01)00433-7.

- Yamazaki, K., Kuromitsu, J. and Tanaka, I. (2002) 'Microarray analysis of gene expression changes in mouse liver induced by peroxisome proliferator-activated receptor α agonists', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 290(3), pp. 1114–1122. doi: 10.1006/bbrc.2001.6319.
- Yan, Z., Yan, H. and Ou, H. (2012) 'Human thyroxine binding globulin (TBG) promoter directs efficient and sustaining transgene expression in liver-specific pattern', *Gene*. Elsevier B.V., 506(2), pp. 289–294. doi: 10.1016/j.gene.2012.07.009.
- Yi, X. *et al.* (2020) 'Ubiquitin-like protein FAT10 promotes osteosarcoma growth by modifying the ubiquitination and degradation of YAP1', *Experimental Cell Research*. Elsevier Inc., p. 111804. doi: 10.1016/j.yexcr.2019.111804.
- Younossi, Z. *et al.* (2019) 'Global Perspectives on Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Nonalcoholic Steatohepatitis', *Hepatology*, 69(6), pp. 2672–2682. doi: 10.1002/hep.30251.
- Younossi, Z. M. *et al.* (2008) 'A novel diagnostic biomarker panel for obesity-related nonalcoholic steatohepatitis (NASH)', *Obesity Surgery*, 18(11), pp. 1430–1437. doi: 10.1007/s11695-008-9506-y.
- Younossi, Z. M. (2019) 'Non-alcoholic fatty liver disease – A global public health perspective', *Journal of Hepatology*. European Association for the Study of the Liver, 70(3), pp. 531–544. doi: 10.1016/j.jhep.2018.10.033.
- Younossi, Z. M. *et al.* (2019) 'Obeticholic acid for the treatment of non-alcoholic steatohepatitis: interim analysis from a multicentre, randomised, placebo-controlled phase 3 trial', *The Lancet*, 394(10215), pp. 2184–2196. doi: 10.1016/S0140-6736(19)33041-7.
- Yu, K. *et al.* (1995) 'Differential activation of peroxisome proliferator-activated receptors by eicosanoids', *Journal of Biological Chemistry*. © 1995 ASBMB. Currently published by Elsevier Inc; originally published by American Society for Biochemistry and Molecular Biology., 270(41), pp. 23975–23983. doi: 10.1074/jbc.270.41.23975.
- Yu, X. *et al.* (2012) 'Identification of a novel binding protein of FAT10: Eukaryotic translation elongation factor 1A1', *Digestive Diseases and Sciences*, 57(9), pp. 2347–2354. doi: 10.1007/s10620-012-2189-1.
- Yuan, L. *et al.* (2022) 'Crystal structures reveal catalytic and regulatory mechanisms of the dual-specificity ubiquitin / FAT10 E1 enzyme Uba6'. Springer US. doi: 10.1038/s41467-022-32613-5.
- Yuan, R. *et al.* (2014) 'Ubiquitin-like Protein FAT10 Promotes the Invasion and Metastasis of Hepatocellular Carcinoma by Modifying β -Catenin Degradation', *Cancer Res*. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-14-0284.
- Zeybel, M. *et al.* (2015) 'Differential DNA methylation of genes involved in fibrosis progression in non-alcoholic fatty liver disease and alcoholic liver disease', *Clinical Epigenetics*, 7(1), pp. 1–11. doi: 10.1186/s13148-015-0056-6.
- Zhang, D. W., Jeang, K. T. and Lee, C. G. L. (2006) 'p53 negatively regulates the expression of FAT10, a gene upregulated in various cancers', *Oncogene*, 25(16), pp. 2318–2327. doi: 10.1038/sj.onc.1209220.
- Zhang, Y. *et al.* (2021) 'FAT10 promotes hepatocellular carcinoma (HCC) carcinogenesis by mediating P53 degradation and acts as a prognostic indicator of HCC', *Journal of Gastrointestinal Oncology*, 12(4), pp. 1823–1837. doi: 10.21037/jgo-21-374.
- Zhao, C. *et al.* (2018) 'Knockdown of ubiquitin D inhibits adipogenesis during the differentiation of porcine intramuscular and subcutaneous preadipocytes', *Cell Proliferation*, 51(2), pp. 1–11. doi: 10.1111/cpr.12401.
- Zhao, Z. *et al.* (2018) 'Hepatic PPAR α Function Is Controlled by Polyubiquitination and Proteasome-Mediated Degradation Through the Coordinated Actions of PAQR3 and HUWE1', *Hepatology*, 68(1). doi: 10.1002/hep.29786/supinfo.
- Zheng, L. *et al.* (2010) 'Effect of miRNA-10b in regulating cellular steatosis level by targeting PPAR- α expression, a novel mechanism for the pathogenesis of NAFLD', *Journal of Gastroenterology and Hepatology (Australia)*, 25(1), pp. 156–163. doi: 10.1111/j.1440-1746.2009.05949.x.
- Zhou, Q. *et al.* (2018) 'FAT10 attenuates hypoxia-induced cardiomyocyte apoptosis by stabilizing caveolin-3', *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. Elsevier, 116(February), pp. 115–124. doi: 10.1016/j.yjmcc.2018.02.008.
- Zhou, X. *et al.* (2020) 'Novel interplay between sonic hedgehog and transforming growth factor- β 1 in human nonalcoholic steatohepatitis', *Applied Immunohistochemistry and Molecular Morphology*, 28(2), pp. 154–160. doi: 10.1097/PAI.0000000000000724.
- Zou, Y. *et al.* (2018) 'FAT10 promotes the invasion and migration of breast cancer cell through stabilization of ZEB2', *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Elsevier Ltd, 506(3), pp. 563–570. doi: 10.1016/j.bbrc.2018.10.109.

Annexes

1) Articles soumis

- L CLAVREUL, A Cotte, L Bernard, N Hennuyer, JT Haas, A Verrijken, C Gheeraert, B Derudas, E Vallez, L Van Gaal, G Lassailly, S Francque, B Staels, R Paumelle « **The ubiquitin-like modifier FAT10 is upregulated in NASH and impairs PPAR α activity** ». [Vous trouverez ci-après le manuscrit de cet article tel qu'il a été soumis au journal *Cell Metabolism* le 05 septembre 2022.](#)

2) Communications en congrès nationaux et internationaux

a. Communications orales

- 91^{ème} journées scientifiques de l'AFEF (Octobre 2022), Dijon, AFEF (Association Française pour l'Étude du Foie) : « **Rôle de FAT10/UBD dans le développement et la progression de la NASH : impact sur l'activité de PPAR α** ».
- PreciNASH symposium (12 janvier 2022), Lille : « **FAT10 overexpression in NASH: Impact on PPAR α activity** ».
- Journée André Verbert 2020, (Novembre 2020), format Webinaire : « **Role of FAT10 NASH development and progression: impact on PPAR α degradation/(de)activation** ».
- 87^{ème} journées de l'AFEF (Octobre 2020), Paris, AFEF : « **Rôle de FAT10 dans le développement et la progression de la NASH: impact sur la dégradation/(dé)activation de PPAR α** ».
- EGID Thematic School (Octobre 2019), Bruges, EGID (European Genomic Institute for Diabetes) : « **Impact of FAT10 overexpression on NASH development and progression** ».

b. Communications affichées

- EGID Thematic School (Octobre 2022), Bruges, EGID (European Genomic Institute for Diabetes) : « **Role of FAT10/UBD in NASH development and progression: impact on PPAR α activity** ».
- 8th Paris NASH meeting (Septembre 2022), Paris : « **Role of FAT10/UBD in NASH development and progression: impact on PPAR α activity** ».
- International Liver Congress (Juin 2022), Londres, EASL (European Association for the Study of the Liver) : « **Role of FAT10/UBD in NASH development and progression: impact on PPAR α activity** ».

- 6th EGID Symposium, (Décembre 2021), Lille, EGID : « **Role of FAT10/UBD in NASH development and progression: impact on PPAR α activity** ».
- 16^{ème} congrès de la NSFA, (Juin 2021), format webinaire, NSFA (Nouvelle Société Française d'Athérosclérose) : « **Rôle de FAT10/UBD dans le développement et la progression de la NASH : impact sur la dégradation/ (dé)activation de PPAR α** ». **Obtention du « Prix Congrès NSFA - catégorie Sélection du Jury ».**
- EGID Thematic School (Octobre 2019), Bruges, EGID : « **Impact of FAT10 on PPAR-alpha downregulation during NASH progression** ».
- NAFLD summit, (Septembre 2019), Séville, EASL : « **Impact of FAT10 on PPAR-alpha downregulation during NASH progression**».

3) Obtention de bourses de financement

- Obtention d'une bourse de prolongation de thèse de **12 mois** (Juin 2021), NSFA : « **Rôle de FAT10 dans le développement et la progression de la NASH : impact sur l'expression et l'activité de PPAR α** ».

The ubiquitin-like modifier FAT10 is upregulated in NASH and impairs PPAR α activity

Ludivine Clavreul^{1*}, Alexia Cotte^{1*}, Lucie Bernard¹, Nathalie Hennuyer¹, Joel T. Haas¹, An Verrijken^{3, 4}, Céline Gheeraert¹, Bruno Derudas¹, Emmanuelle Vallez¹, Luc Van Gaal^{3, 4}, Guillaume Lassailly⁵, Sven Francque^{2,3,6}, Bart Staels^{1,7}, Réjane Paumelle^{1,7}

1 University of Lille, Inserm, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, U1011, EGID, Lille, France

2 Department of Gastroenterology and Hepatology, Antwerp University Hospital, Antwerp, Belgium

3 Laboratory of Experimental Medicine and Paediatrics, Faculty of Medicine and Health Sciences, University of Antwerp, Antwerp, Belgium

4 Department of Endocrinology, Diabetology and Metabolism, Antwerp University Hospital, Antwerp, Belgium

5 CHU, Lille, France

6 European Reference Network on Hepatological Diseases (ERN RARE-LIVER)

7 These authors contributed equally

* Co-first authors

Keywords:

NAFLD, NASH, Liver, PPAR α , FAT10, UBD

Funding Sources:

This work was supported by the Nouvelle Société Française d’Athérosclérose (NSFA, to LC), the FP7 “RESOLVE” (Grant ID: 305707 to BS, AV, SF, LVG) by FP6 “HEPADIP” (Contract LSHM-CT-2005-018734 to SF, LVG, BS), the European Genomic Institute for Diabetes (EGID, ANR-10-LABX-0046 to BS), the Agence Nationale de la Recherche PreciNASH (ANR-16-RHUS-0006 to BS), DeCodeNASH (ANR-20-CE14-0034 to JTH) the Association Française pour l’Etude du Foie (AFEF, to RP) and the Contrat Plan État-Région Hauts-de-France-Centre Transdisciplinaire de la Recherche sur la Longévité (CPER-CTRL) (to RP and AC). LC was supported by a PhD fellowship from Institut Pasteur de Lille and Région Haut de France (France). JTH was supported by an EMBO Long Term Fellowship (ALTF 277-2014). BS is a recipient of an ERC Advanced Grant (no. 694717). SF received a senior clinical research fellowship from the Research Foundation Flanders (1802154N). The project was also partially funded by the Antwerp University (GOA 2018, ID36572).

Acknowledgments:

We thank M. Tardivel and A. Bongiovanni of the BiImaging Center (Lille University School of Medicine Research centre) for expertise and training. We also thank the animal core facility of the Pasteur Institute Lille. We thank J. Chevalier for bioinformatics expertise and training of Galaxy.

Abbreviations:

ACAA1 Acetyl-CoA Acyltransferase 1

ACO Acyl-CoA oxidase

Ad	Adenovirus
ALAT	Alanine aminotransferase
ANOVA	Analysis of variance
ASAT	Aspartate aminotransferase
ASH	Alcoholic Hepatitis
CPT1α	Carnitine palmitoyltransferase 1 alpha
FAT10	Human leukocyte antigen-F Associated Transcript 10
CDA	Choline-Deficient diet enriched in cholesterol, fat, glucose and fructose
FATP1	Fatty Acid Transporter 1
GO	Gene Ontology
HCC	Hepatocellular Carcinoma
HFSC	High Fat diet supplemented with Sucrose and Cholesterol
HMGCS2	3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase 2
IF	Immunofluorescence
IFNγ	Interferon gamma
LSI	Lifestyle Intervention
MCD	Methionine and Choline-Deficient
NAFLD	Non-Alcoholic Fatty Liver Diseases
NAS	NASH Activity Score
NASH	Non-Alcoholic Steatohepatitis
NKT	Natural Killer T
NPC	Non-Parenchymal Cells
PH	Primary Hepatocytes
PLA	Proximity Ligation Assay

PPAR α Peroxisome Proliferator-Activated Receptor alpha
SLC27A1 Solute Carrier Family 27 Member 1
TNF α Tumor Necrosis Factor alpha
UBD Ubiquitin D

Abstract:

Peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR α) is a promising therapeutic target against Non-Alcoholic Steatohepatitis (NASH). However, its expression and activity decrease during disease progression and several of its agonists did not achieve sufficient efficiency in clinical trials. Here, we identified the Human leukocyte antigen-F Associated Transcript 10 (FAT10) as an inhibitor of PPAR α activity during NASH progression.

In vivo, the expression of FAT10 is upregulated in human and murine livers upon progression to NASH and correlates negatively with PPAR α expression. The increase of FAT10 occurs in hepatocytes in which both proteins directly interact. FAT10 silencing *in vitro* induces PPAR α target gene expression in hepatocytes and promotes fatty acid oxidation. Moreover, Fat10 overexpression *in vivo* inhibits PPAR α target gene induction in response to fasting and agonist treatment.

Altogether, FAT10 is induced during NASH development and interacts with PPAR α resulting in a decreased response of PPAR α to fasting or agonists. Inhibition of the PPAR α -FAT10 interaction may provide a means to design potential therapeutic strategies against NASH.

Introduction:

As sedentary lifestyle and high caloric diet become more and more common, the prevalence of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) increases (Mitra, De and Chowdhury, 2020). NAFLD covers a spectrum of liver abnormalities starting with, most frequently in obese patients, an accumulation of triglycerides in hepatocytes, called steatosis or Non-Alcoholic Fatty Liver (NAFL). Steatosis can evolve upon the development of inflammation and liver cell damage (evidenced by ballooning of hepatocytes) to Non-Alcoholic Steatohepatitis (NASH), the more aggressive stage of the NAFLD (Haas, Francque and Staels, 2016). NASH is a risk factor for the development of clinical hepatic and extra-hepatic disorders, such as cardiovascular diseases, type 2 diabetes, cirrhosis, and hepatocellular carcinoma (HCC) (Younossi *et al.*, 2018; Montaigne, Butruille and Staels, 2021). Therefore, molecules targeting a large number of pathways are in development to cure NASH, but no treatment has been approved so far (Ferguson and Finck, 2021).

Peroxisome Proliferator-Activated Receptors (PPARs), transcription factors belonging to the nuclear receptor family, are amongst the most promising targets. Within the PPAR family, PPAR α , which is highly expressed in the liver, has been shown to modulate NASH in preclinical animal models (Pawlak, Lefebvre and Staels, 2015). In hepatocytes, PPAR α regulates numerous pathways involved in energy homeostasis through the transcriptional regulation of its target genes. PPAR α modulates energy metabolism both during physiological nutritional transition states as well as under pathological conditions. Indeed, under fasting conditions, PPAR α induces the transcription of genes involved in lipid uptake (Solute Carrier Family 27 Member 1 or Fatty Acid Transporter 1 (*SLC27A1* or *FATP1*)), mitochondrial and peroxisomal beta-oxidation (Carnitine palmitoyltransferase 1 (*CPT1 α*), Acyl-CoA oxidase (ACO) and

Acetyl-CoA Acyltransferase 1 (*ACAA1*) and ketogenesis (3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase 2 (*HMGCS2*)) in hepatocytes (Montagner *et al.*, 2016). In line, PPAR α deficiency in mice promotes the development of obesity and NAFLD in response to high fat diet feeding (Lalloyer *et al.*, 2011). On the contrary, PPAR α activation with selective agonists, such as pemafibrate, prevents diet-induced dyslipidaemia and NASH development (Ip *et al.*, 2004; Shiri-Sverdlov *et al.*, 2006; Hennuyer *et al.*, 2016). PPAR α activation also reduces hepatic inflammation and fibrosis through its transrepressive anti-inflammatory activity (Pawlak *et al.*, 2014). Unfortunately, hepatic PPAR α gene expression decreases during NASH progression (Francque *et al.*, 2015; Okishio *et al.*, 2020). Moreover, although promising effects have been observed (Ratziu *et al.*, 2016), the activation of PPAR α with selective or dual agonists in NASH patients has been proven insufficiently effective to cure the disease. Indeed, the dual PPAR α/δ agonist elafibranor (ClinicalTrials.gov NCT02704403) failed in phase 3, and older fibrates have yielded mixed results in NASH (as reviewed by Pawlak, Lefebvre and Staels, 2015, PMID 33093663). A better understanding of the mechanisms modulating PPAR α activity in NASH livers is therefore crucial to evaluate its potential as target for NAFLD treatment.

In the present work, we searched for genes upregulated in NAFLD and negatively correlating with PPAR α expression to identify novel mechanisms of PPAR α modulation during the progression of NASH. Transcriptomic analysis of human livers identified the gene *UBD* (Ubiquitin D, referred as *FAT10* hereinafter) which encodes the Human leukocyte antigen-F Associated transcript 10 (FAT10), a protein member of the ubiquitin-like family (Fan *et al.*, 1996), as a potential candidate. FAT10 is composed of two ubiquitin-like domains linked by a linker and a di-glycine motif at its C-terminal end (Aichem *et al.*, 2018). This latter motif allows FAT10 to interact

covalently with its partners through an enzymatic cascade called FATylation (Schmidtke, Aichele and Groettrup, 2014). FATylation can then lead to proteasomal or lysosomal degradation of the FATylated proteins (Kalveram, Schmidtke and Groettrup, 2008). Under physiological conditions, FAT10 is exclusively expressed in the immune system. However, pro-inflammatory stimuli induce its expression also in other organs like the liver (Choi, Kim and Yoo, 2014). Here, we identify FAT10 as a modulator of PPAR α activity in hepatocytes induced during the progression to NASH.

Results:

- 1) FAT10 is elevated in NASH patient livers and correlates negatively with PPAR α expression

To identify genes potentially modulating the down-regulation of PPAR α expression and activity during NASH progression, hepatic transcriptomic data from a large cohort of obese patients spanning all histological stages of NAFLD were assessed to identify genes upregulated in livers of NASH patients (Francque *et al.*, 2015). Gene Ontology (GO) term pathway analysis (Suppl. Fig. 1A) confirmed previous findings that “PPAR signalling pathways” are dysregulated in NASH vs no-NASH patients, data in line with the down-regulation of PPAR α upon NASH progression (Francque *et al.*, 2015). Differential gene expression analysis comparing no-NASH (N=76) and NASH (N=129) patients identified a subset of genes whose expression is induced in NASH livers (Suppl. Fig. 1B). As expected, the expression of genes involved in inflammation, such as *CXCL10* and *CXCL9*, is elevated in the livers of NASH patients (Haas *et al.*, 2019). Interestingly, *FAT10* mRNA was two-fold higher in NASH livers, both at the mRNA (Fig. 1A) as well as at the protein level as demonstrated by immunofluorescence (IF)

analysis (Fig. 1B). Interestingly, staining for FAT10 mainly localized in hepatocytes. Moreover, *FAT10* expression positively correlated with the expression of inflammatory genes associated with NAFLD severity, such as *CXCL9*, *CXCL10* and *IL32* (Suppl. Fig. 1C)(Dali-Youcef *et al.*, 2019), suggesting that FAT10 expression increases in parallel with the inflammation appearing with NASH development.

FAT10 gene expression progressively increased with the severity of the disease (Fig. 1C) and positively correlated with all histological NAFLD parameters, *i.e.* steatosis, ballooning and inflammation (Fig. 1D)(Kleiner *et al.*, 2005). Moreover, liver *FAT10* expression decreased upon NASH resolution after 12 months of weight loss treatment (diet or bariatric surgery; Fig. 1E), whereas *PPAR α* expression was restored during NASH regression in these patients (Francque *et al.*, 2015).

Interestingly, *FAT10* expression correlated negatively with expression of *PPAR α* (Fig. 1F) and its target genes (Fig. 1G), such as *HMGCS2* or *ACAA1*, suggesting that *FAT10* upregulation is associated with an impairment of lipid metabolism regulated by *PPAR α* signalling.

Taken together, these observations show that *FAT10* gene expression is upregulated in NASH livers and correlates positively with disease severity and negatively with the expression of *PPAR α* and its target genes.

2) FAT10 is overexpressed in hepatocytes and correlates negatively with PPAR α during NASH development in murine livers

Next, *FAT10* and *PPAR α* expression levels were analysed in livers of several murine models of NASH. *Fat10* gene expression, measured by qPCR in total liver, was already induced after two weeks and further increased after 5 weeks of feeding a

choline-deficient diet enriched in cholesterol, fat, glucose and fructose (CDAA) (Fig. 2A). Interestingly, a similar increase in *Fat10* mRNA levels was also observed in livers of mice fed a high fat diet supplemented with sucrose and cholesterol (HFSC (Haas *et al.*, 2019), Fig. 2B) and of db/db mice fed a methionine and choline-deficient (MCD) diet (data not shown)(Kita *et al.*, 2012). These data demonstrate that *Fat10* expression is increased in several murine models of diet-induced NASH.

In the liver, *Ppara* is highest expressed in hepatocytes in which it plays a crucial role in NAFLD prevention (Montagner *et al.*, 2016). Consequently, *Fat10* expression was studied in primary hepatocytes (PH) vs non-parenchymal cells (NPC) isolated from livers of mice after 2 weeks of CDAA diet feeding. Transcriptional analysis (Fig. 2C) showed that *Fat10* is among the genes induced in PH of CDAA compared to CSAA mice. As expected (Schregle *et al.*, 2018), *Fat10* is expressed in the immune cell-containing NPC fraction, but its expression is not increased in these cells upon CDAA diet feeding (Fig. 2D). In line, *Fat10* IF staining is increased mainly in hepatocytes in CDAA but not CSAA-fed mice (Fig. 2E). Moreover, *Fat10* mRNA levels correlate negatively with *Ppara* expression (Fig. 2F) and with GO terms pathways associated to *Ppara* regulated pathways, such as “Cholesterol metabolic process” (*Acaa2*, *Apoa1*) and “Fatty acid beta-oxidation” (*Abcd3*, *Slc27a2*; Fig. 2G). *Fat10* mRNA levels also correlate negatively with the expression of *Hmgcs2*, a *Ppara* target gene involved in ketogenesis (Fig. 2H).

Altogether, these results demonstrate that *Fat10* is overexpressed specifically in hepatocytes in distinct murine models of NASH and correlates negatively with *Ppara* and its target genes suggesting a direct implication for *Fat10* in the modulation of *Ppara* activity in hepatocytes.

3) FAT10 interacts with PPAR α in human and mouse hepatocytes

Since interactions of FAT10 with other proteins modulate their expression or activity through a post-translational modification called FATylation (Aichem and Groettrup, 2020), we next assessed whether FAT10 interacts with PPAR α *in vitro* in hepatocytes overexpressing FAT10.

To mimic the transition to inflammatory NASH, PH were incubated with Tumor Necrosis Factor α (TNF α) and Interferon γ (IFN γ), two cytokines secreted in the liver during the transition from steatosis to NASH. Interestingly, *Fat10* gene expression was induced reaching a maximum after 24 hours of cytokine treatment (Fig. 3A). Similar inductions were observed both in HepG2 and immortalized human hepatocytes (IHH) at the gene (Suppl. Fig. 2A-B) and protein (Suppl. Fig. 2C-D) levels. Moreover, after 24 hours of cytokine treatment, FATylation activity was increased in HepG2 cells as shown by western blot analysis of the FATylated protein profile (Fig. 3B). In these conditions, IF labelling revealed PPAR α and FAT10 colocalization in the nucleus of HepG2 cells, suggesting a close proximity and hence, a possible interaction between these two proteins (Suppl. Fig. 2E).

Indeed, a direct interaction between FAT10 and PPAR α in cytokine treated HepG2 and IHH cells was observed in a co-immunoprecipitation assay (Fig. 3C). The FAT10/PPAR α interaction was confirmed *in situ* by Proximity Ligation Assay (PLA), revealing an increased number of interactions not only in the nucleus, but also in the cytoplasm of cytokine treated HepG2 cells (Fig. 3D). Finally, increased FAT10/PPAR α interactions were observed in CDAA livers (Fig. 3E) and in livers of NASH patients by PLA (Fig. 3F).

Altogether, these results demonstrate that FAT10 and PPAR α interact *in vitro*, in hepatocytes upon FAT10 induction, and *in vivo*, in human and murine hepatocytes during NASH development.

4) FAT10 silencing enhances PPAR α regulation of lipid metabolism in human hepatocytes

To analyse the functional impact of the FAT10/PPAR α interaction on PPAR α signalling, the effect of FAT10 siRNA knockdown (siFAT10) on PPAR α activity was assessed in cytokine treated HepG2 cells (Suppl. Fig. 3A). Interestingly, knockdown of FAT10 increased PPAR α target gene expression, whereas PPAR α knockdown decreased mRNA levels of its target genes, such as *HMGCS2* and *PDK4*, measured by qPCR analysis (Fig. 4A). In addition, PPAR α downregulation, in combination with FAT10 knockdown, abrogated the increase in PPAR α target gene expression demonstrating PPAR α -dependency of the siFAT10 effect on PPAR α target genes (Fig. 4A).

Next, the impact of FAT10 downregulation on PPAR α function was assessed by measuring lipid droplet accumulation and mitochondrial respiration in hepatocytes. Whereas PPAR α downregulation increased the number of lipid droplets per cell, FAT10 knockdown decreased these as quantified by Bodipy staining (Fig. 4B). This result is consistent because PPAR α downregulation increases lipid droplet content while it is decreased in cells where FAT10 is downregulated and PPAR α activity is shown to be increased. However, the combined knockdown of FAT10 and PPAR α reduced significantly the effect of FAT10 knockdown on lipid droplet accumulation. Moreover, PPAR α knockdown decreased the maximal cellular respiration rate of the

cells, whereas FAT10 knockdown increased it (Fig. 4C). Again, combined FAT10 and PPAR α knockdown decreased the effect of siFAT10 alone. These data demonstrate that FAT10 silencing increases mitochondrial activity and decreases lipid droplet accumulation by modulating PPAR α activity.

Conversely, stable FAT10 overexpression in HepG2 cells after lentiviral infection (Suppl. Fig. 3B-C) increased lipid droplet accumulation (Suppl. Fig. 3D) and decreased the mitochondrial respiration rate (Suppl. Fig. 3E), both the basal and maximal oxygen consumption rate.

Altogether, these results demonstrate that FAT10 downregulation promotes PPAR α activity and lipid metabolism in a PPAR α -dependent manner, while FAT10 overexpression impairs lipid metabolism in human hepatocytes *in vitro*.

5) Hepatic Fat10 overexpression inhibits Ppara activity in response to fasting *in vivo*

Next, the impact of FAT10 overexpression on PPAR α activity was investigated *in vivo*. Mice were infected with an adenovirus expressing either *Fat10* (Ad-FAT10) or a control adenovirus (Ad-CTRL) and given free access to food or submitted to a fasting period of 18 hours known to activate Ppara transcriptional activity (Kersten *et al.*, 1999).

Fat10 expression was induced in livers of Ad-FAT10 compared to Ad-CTRL infected mice as shown at the protein level by IF staining (Fig. 5A) and at the mRNA level by qPCR analysis (Fig. 5B). As expected, fasting slightly decreased the body weights in both groups of mice without changing microscopic liver structure (Suppl.

Fig. 4A-B) and increased *Ppara* mRNA levels in the livers of Ad-CTRL mice (Fig. 5C). Interestingly, this induction was reduced in Ad-FAT10 mice and a negative correlation between hepatic *Fat10* and *Ppara* mRNA levels was observed under fasting conditions (Fig. 5D).

In line, fasting increased the expression of several *Ppara* target genes, such as *Hmgcs2*, *Cpt1a* and *Aco*, in the livers of Ad-CTRL mice (Fig. 5E). However, this induction was less pronounced in Ad-FAT10 mice and *Fat10* gene expression negatively correlated with the expression of several *Ppara* target genes (Fig. 5F).

PLA analysis of livers of fasting Ad-CTRL and Ad-FAT10 mice revealed an enhanced interaction of *Fat10* and *Ppara* both in the nucleus and cytoplasm of hepatocytes in Ad-Fat10 infected mice (Fig. 5G).

These observations demonstrate that FAT10 overexpression *in vivo* leads to an interaction with *Ppara* and a decreased activation of PPAR α in response to fasting.

6) FAT10 impairs the PPAR α agonist response *in vitro* and *in vivo*

Finally, the impact of FAT10 modulation on PPAR α activation by a synthetic agonist was investigated *in vivo* and *in vitro*. FAT10 knockdown in HepG2 cells (Suppl. Fig. 5A) significantly increased levels of *HMGCS2* and *PDK4* mRNA (Fig. 6A). Moreover, FAT10 knockdown enhanced the induction of these genes in response to pemafibrate indicating an increased response of PPAR α to its agonist upon FAT10 downregulation.

Finally, mice were infected with Ad-FAT10 or Ad-CTRL, treated with pemafibrate, and killed 18 hours later (Suppl. Fig. 5B). Ad-FAT10 injection significantly decreased the expression of *Ppara* and its target genes such as *Hmgcs2*, *Cyp4a14* and *Cyp4a10*

measured by qPCR analysis of total livers (Fig. 6B). Moreover, the induction of their expression upon pemafibrate treatment was less pronounced in Ad-FAT10 mice, indicating a lower Ppar α activation by its agonist when FAT10 is overexpressed.

These data indicate that FAT10 overexpression impairs PPAR α signalling and inhibits its activity in response to a synthetic agonist *in vitro* and *in vivo*.

Discussion:

The present study aimed at identifying mechanisms controlling PPAR α activity during NASH progression. Transcriptomic analysis of a large human cohort of patients allowed us to identify FAT10, a gene encoding an ubiquitin-like protein (Fan *et al.*, 1996), as elevated in the livers of NASH patients. Similar findings showed FAT10 overexpression in livers of patients with chronic hepatic inflammation associated with NASH (Jia *et al.*, 2018; Dali-Youcef *et al.*, 2019; Vandell, Dubois-Chevalier, *et al.*, 2020), alcoholic hepatitis (ASH)(Jia *et al.*, 2018) and hepatocellular carcinoma (HCC)(Zhang *et al.*, 2021). However, FAT10 is known to be constitutively expressed in immune cells, such as dendritic or NKT (Natural Killer T) cells and its expression is induced by pro-inflammatory stimuli in B lymphocytes or monocytes (Schregle *et al.*, 2018). These immune cells are known to infiltrate the liver during NASH development, participating in disease progression (Cai, Zhang and Li, 2019) and could be responsible for the increase in FAT10 expression in inflamed livers. Here, we demonstrated for the first time that *FAT10* is specifically induced in hepatocytes during NASH progression. *FAT10* overexpression in hepatocytes is likely due to inflammation since data from us and others have shown that FAT10 expression is increased by pro-inflammatory cytokines such as TNF α /IFN γ acting via the NF- κ B/ STAT3 pathway (Choi, Kim and Yoo, 2014), both in cancerous and non-cancerous hepatocytes *in vitro*. In addition, we observed a negative correlation between *FAT10* and *PPAR α* expressions in hepatocytes isolated from murine NASH livers and in the livers of NASH patients. Since PPAR α is predominantly expressed in hepatocytes, this result suggests that FAT10 induction in hepatocyte during NASH progression participates in the dysfunction of PPAR α signalling during the disease development.

Indeed, we showed that FAT10 downregulation reduces lipid content and promotes mitochondrial respiration. This improvement of lipid metabolism was associated with an increased expression of PPAR α target genes such as *HMGCS2* and *PDK4*, in a PPAR α dependent manner. Interestingly, such target genes are regulated by PPAR α through a transactivation mechanism (Rakhshandehroo *et al.*, 2010) and previous data have shown that an increased expression of PPAR α target genes, like *HMGCS2*, prevents steatosis development (Asif *et al.*, 2022). By contrast, Fat10 overexpression in mouse livers repressed the induction of Ppara α target genes expression in response to endogenous and exogenous PPAR α ligands. These results indicated that FAT10 acts on lipid metabolism by modulating PPAR α transcriptional activity in response to its ligands and, hence, is a newly discovered modulator of PPAR α -dependent lipid metabolism during NASH progression.

FAT10 acts through an enzymatic cascade catalysed by ligases resulting in its interaction with its partners (Aichem *et al.*, 2010). This process, called FATylation, either promotes degradation (Aichem *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2018) or stabilisation (Yuan *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2016) of its partners. Herein, we demonstrated that FAT10, upon cytokine induction, interacts with PPAR α in hepatocytes identifying PPAR α as a new FAT10 partner during NASH progression. Since PPAR α is its own target gene acting through a PPAR α response element in its own promoter (Pineda-Torra *et al.*, 2002), the post-translational modification of PPAR α by FAT10 may partially explains the down-regulation of PPAR α gene expression. Interestingly, FAT10 does not only induce degradation of its partners. For example, it has been shown to repress p53's transcriptional activity by changing its conformation (Li T, Santockyte R, Yu S, Shen RF, Tekle E, Lee CG, Yang DC, 2011) and to sequester the active form of RIG-

I into insoluble protein aggregates (Nguyen *et al.*, 2016). Further experiments need to be done to test how exactly FAT10 modulates PPAR α activity.

FAT10 interaction with PPAR α also prevents its transcriptional induction by ligands whether they are natural or synthetic. Such observations could be part of the mechanisms explaining the disappointing results obtained in clinical studies with some PPAR α specific or dual agonists. Indeed, fenofibrate (Oscarsson *et al.*, 2018) and elafibranor (Ratziu *et al.*, 2016) were discontinued lacking sufficient efficacy in resolving NASH parameters. We propose that PPAR α activity could be repressed by FAT10, whose expression is induced in hepatocytes during NASH, as such reducing agonist efficacy. Hence, inhibiting FAT10 or its binding to PPAR α could be an approach to enhance PPAR α activity and subsequently, the efficacy of its agonists in the treatment of NASH. FAT10 can be indirectly targeted by a JAK2 inhibitor (Reznik *et al.*, 2019), but, unfortunately, this strategy lacks specificity. Inhibiting FATylation by targeting the ligases involved in FAT10 binding could also block FAT10's effect on PPAR α activity. Such inhibitors have already been developed to inhibit NEDDylation by NEDD8, another ubiquitin-like post-translational modification. Under physiological conditions, NEDD8 is expressed and active in hepatocytes, but during the progression of liver fibrosis or the development of HCC, NEDDylation becomes aberrant and contributes to disease development (Zubiete-Franco *et al.*, 2017; Yu *et al.*, 2018). NEDDylation inhibitor is now a promising therapy against liver cancer (Yang *et al.*, 2019). However, FAT10 has many partners (Leng *et al.*, 2014) and targeting FAT10 or FATylation could impact all other proteins, inducing unwanted effects. Hence, strategies to specifically destabilize the FAT10/ PPAR α interaction is likely a better strategy.

Conclusion:

Overall, our work demonstrates that FAT10 expression is increased in hepatocytes by pro-inflammatory stimuli during progression to NASH. The increase of FAT10 leads to a direct interaction with PPAR α in human and murine hepatocytes. This interaction results in an impaired PPAR α activity in response to fasting or to PPAR α agonists. Thus, FAT10 could act as a negative modulator of PPAR α activity during NASH development.

Materials and methods:

Human and liver samples

All patients were consecutively recruited at the Liver Clinic and Obesity Clinic of the Antwerp University Hospital and underwent hepatologic and metabolic work-ups. Exclusion criteria were alcohol consumption >2 U/day for women and >3 U/day for men, liver diseases other than NAFLD, age <18 years, liver cirrhosis. For the baseline gene expression analysis in the liver, patients (N=155, including no liver disease N=27, isolated steatosis N=22 (NAFL), NASH N=106) were selected from the cohort. Selected obese NASH patients with paired biopsies at 1 year follow-up (lifestyle intervention (LSI) N=20, Roux-en-Y Gastric Bypass (RYGB) N=21) were included for gene expression analysis.

For the immunofluorescence assays, biopsies were selected amongst the cohort according to histological parameters: 5 control patients (steatosis, inflammation, ballooning and fibrosis = 0) and 10 NASH patients (steatosis > 1 or 33%, inflammation \geq 1, ballooning \geq 2 and fibrosis \leq 3 (Kleiner *et al.*, 2005)) were selected.

The study protocol is part of the Hepadip protocol (Belgian registration number B30020071389) and was approved by the Ethical Committee of the Antwerp University Hospital (file 6/25/125). Written informed consent was obtained from all patients.

Animal studies

Wild-type male C57BL/6J mice (8 weeks of age) were purchased from Charles River Laboratories (France). Mice were maintained in pathogen-free environment (12:12 hour light/dark cycle, 21°C-24°C) with ad libitum access to water and food.

Littermate animals were randomized by body weight prior to the start of the diet. Mice were fed either with a control diet (CSAA, kcal %; protein 12%, fat 16%, carbohydrates 72%, SSIFF Spezialdiäten GmbH, E15668-04) or a choline deficient diet with low methionine level (CDAA, kcal%, protein 11%, fat 31%, carbohydrates 58%, SSIFF Spezialdiäten GmbH, E15666-947) enriched with 1% (by weight) cholesterol and supplemented with a drinking water composed of 55% of fructose (23.1g/L, Sigma) and 45% of glucose (18.9g/L, Sigma) for 2 or 5 weeks. Then, total liver was taken or mouse primary hepatocytes were isolated from CSAA or CDAA mice using collagenase perfusion as described before (Bantubungi *et al.*, 2014) to undergo Affymetrix assay.

Fat10 overexpression was performed on C57BL/6J wild-type mice (8 weeks of age) by injecting via the tail vein a solution containing 2.5×10^8 genome copies (GC) of a control adenovirus: Ad-CTRL (N=10) or the overexpressing adenovirus: Ad-FAT10 (N=9) both purchased from Genecust. Four days after adenovirus injections, mice were fasted during 18 hours and the liver and blood samples were taken.

All experiments were performed following approval by the Ethics Committee for Animal Experimentation from Nord-Pas de Calais Region (APAFIS #33526-2021092316263268 v4).

Transcriptomics

Anthropometric, histological and metabolic characteristics, RNA extraction, purification, labelling and hybridization procedures have been previously reported (Francque *et al.*, 2015). Transcriptome analysis was performed using Affymetrix Human Gene (HuGene) 2.0ST and .CEL files were normalized as above. Gene Expression Omnibus (GEO) repository accession number for microarray data is

GSE212617. The correlations were calculated with the Pearson tests. Data handling was performed using the GIANT module in Galaxy (Galaxy tool ID : testtoolshed.g2.bx.psu.edu/repos/vandelj/giant_gsea_format/giant_gsea_format/0.2.0; Galaxy Version 0.2.0; Normalization: NetAffx Annotation Release 36, July 2016)(Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, Mukherjee S, Ebert BL, Gillette MA, Paulovich A, Pomeroy SL, Golub TR, Lander ES, 2005; Gu *et al.*, 2014; Inc., 2015; Ritchie *et al.*, 2015; Galili *et al.*, 2018; Scientific, 2018; Vandel, Gheeraert, *et al.*, 2020).

RNA extraction and quantitative real-time PCR

Trizol reagent was used to extract total messenger RNA (mRNA) from cells and tissues. The mRNA samples were then reverse transcribed into complementary DNA (cDNA) according manufacturer's protocol of the kit (Applied Biosystems, Thermofischer Scientific). Then, mRNA expression was assessed with a real-time qPCR using SYBR Green PCR Master Mix or TaqMan PCR Master Mix and the normalization was made with the respective housekeeping genes Cyclophilin and β -actin. The primers and probes are listed in Supplementary table 1.

Western blot analysis

Cells were gathered in PBS and resuspended in RIPA buffer containing PMSF and phosphatase inhibitor after centrifugation at 400g for 10 minutes and lysed for 10 more minutes on ice. BCA kit was then used to assess the protein concentration of these samples. 40 μ g of proteins were denatured with Laemmli buffer, subjected to 10% or 12% SDS-PAGE and transferred onto a nitrocellulose membrane. Primary antibodies, listed in the Supplementary table 2, were diluted in TBS supplemented with 0.01% of tween and 5% of powder milk and used to incubate the membranes overnight

at 4°C. The corresponding secondary antibodies were then incubated for 1 hour at room temperature and chemiluminescence signals were detected thanks to Dura detection kit on the IBright.

Cell lines and cell culture

The human cell line HepG2 (cat. no. HB-8065, ATCC) was cultured in Minimum Essential Medium (MEM, 11095080, GIBCO) supplemented with 10% FBS, MEM Non-essential Amino Acids (NEAA, 11140035, GIBCO) and Sodium Pyruvate (11360070, GIBCO). The human cell line IHH was cultured in William's E Medium (22551022, GIBCO) supplemented with 10% FBS, 20 mU/mL of bovine insulin (I5500, Sigma) and 50nM of Dexamethasone (D1756, Sigma). They were both kept in a humidified atmosphere of 5% CO₂ in a 37°C incubator.

Cell transfection, stimulation, and lentivirus

IHH and HepG2 cells were transfected with siRNA targeting FAT10 (Smart pool siGENOME UBD) or a siRNA control (siCTRL, Horizon Discovery) using the Dharmafect (Horizon Discovery) reagent according to the manufacturer's instructions. After 24 hours of siRNA transfection, HepG2, IHH or primary murine hepatocytes were respectively treated or not with a cocktail of 50ng/mL of human TNF α (BMS301, eBioscience) or murine Tnf α (410-MT-025, eBioscience) and 10ng/mL of human IFN γ (RIFNG50, Thermo Scientific) or murine Ifn γ (485-MI-100, eBioscience) to induce endogenous FAT10. After 40 hours of siRNA transfection and 16 hours of cytokines treatments, cells were treated with 1 μ M of Pemafibrate during 8 more hours.

For the overexpression of FAT10 in HepG2 cells, the lentiviral vectors containing FAT10-MykDDK tagged vector and the gene to resistance to puromycin were purchased from Origene. HepG2 cells were infected with these particles in HepG2 medium and in presence of polybrene during 48 hours. Then, the cells were selected by treatment with 0.5 μ M puromycin.

Seahorse analysis

Measurements of oxygen consumption rate (OCR) were performed using the XFe24 apparatus (Seahorse Bioscience, North Billerica, MA). Cells were plated into XFe24 (V7) polystyrene culture plates (Seahorse Bioscience, North Billerica) at 70 000 cells/well (XFe24 plate). The cells were incubated for 24 hours and transfected, if needed, with siRNA for 48 hours as previously described. Sensor cartridges were calibrated prior to each assay. Then, the cells incubated for 1h in complete Seahorse assay medium (10mM Glucose, 2mM Glutamine) in a 37°C/non-CO₂ incubator before the start of the assay. All experiments were performed at 37°C. Each cycle of measurement was design as follow: a mixing time of 3 minutes, a waiting time of 2 minutes and a data acquisition period of 3 minutes. OCR data points represent to the average rates during the measurement cycles. Oligomycin, FCCP and Rotenone/Antimycin A were prepared at respectively 2 μ M, 1 μ M and 0.5 μ M.

BODIPY 493/503 staining

Cells seeded on coverslips were fixed in 4% PFA for 10 minutes at 4°C and incubated with Bodipy 493/503 (Molecular Probes) at 200ng/mL and NucBlue (Invitrogen) for 20 minutes at room temperature. Cells were mounted in fluorescent mounting medium (Dako). Acquisitions were performed using an inverted confocal

microscope (Spinning Disk, Zeiss) with 40X oil immersion lens (NA 1.3 with an optical resolution of 176 nm) and 1.8X digital zoom or a dry 20X lens. Bodipy and NucBlue fluorescence were imaged using argon 488nm and UV lasers, respectively. Images were processed with Zen and analyzed with Icy programs.

Immunofluorescence

Cells seeded on glass coverslips previously coated with Polylysine were washed with cold PBS and fixed with 4% paraformaldehyde (PFA) for 10 minutes at 4°C. Cells were permeabilized and blocked with a solution containing 1% of Bovine Serum Albumin (BSA) and 0.2% Triton X-100 in PBS at room temperature for 30 minutes. Cells were then incubated overnight at 4°C with the following primary antibodies: FAT10 (LS Bio, LS-C166057) and PPAR α (Santa Cruz, sc-398394) in blocking solution. Then, cells were washed and incubated 1h at room temperature with secondary antibodies coupled respectively to Alexa 488 and Alexa 594 (Molecular Probes by Life technologies) diluted in blocking solution containing NucBlue (Invitrogen). Cells were mounted in fluorescence mounting medium (Dako).

Human or murine liver biopsy sections were incubated overnight at 4°C with a primary antibodies anti FAT10 (described before). Then, human or murine tissues were respectively incubated with Alexa fluor 488 or Alexa fluor 594 Tyramide SuperBoost anti-rabbit antibody, and revealed as indicated by the supplier (Thermofischer Scientific). Sections were then incubated 20 minutes with a solution of NucBlue (Invitrogen) in PBS during 20 minutes before being mounted in fluorescence mounting medium (Dako).

Acquisition for immunofluorescence were performed using an inverted confocal microscope (Spinning disk, Zeiss) with a 40X oil-immersion lens (NA 1.3 with an optical

resolution of 176 nm) or a slide scanner microscope Axio Scan, Z1 (Zeiss) with a 20X dry lens (NA 0.8). Alexa 594, Alexa 488 and NucBlue were imaged using UV, argon 488nm and 561nm lasers.

Images were processed with Zen software and analyzed with Icy software.

Proximity Ligation Assay

Proximity Ligation Assay (PLA) was performed on cells and tissues with the same primary antibodies for FAT10 and PPAR α (mentioned before) as indicated by the supplier (Sigma).

Images were acquired using an inverted confocal microscope (Spinning disk, Zeiss) with a 40X oil-immersion lens as described before.

Histological analysis

Mouse liver samples were fixed with 4% PFA, embedded in paraffin and stained with haematoxylin and eosin. Images were obtained using a slide scanner microscope Axio Scan, Z1 (Zeiss) with a X20 dry lens (NA 0.8).

The NAS score was obtained by adding the scores for steatosis, inflammation and ballooning determined by visual analyses of the tissues (Kleiner *et al.*, 2005).

Co-Immunoprecipitations (Co-IP) assay

HepG2 and IHH cells were treated with recombinant cytokines as described before to induce endogenous FAT10. They were lysed in ice cold IP buffer provided in the kit (88805, Thermofischer Scientific). The cell lysates were then incubated with the FAT10 antibody (Millipore), which was beforehand conjugated to magnetic beads, at

4°C overnight. After that, proteins conjugated to the beads were eluted and subjected to Western Blot assays as described before.

Statistical analysis

All data were expressed as mean \pm standard deviation (SD) or standard error of measurement (SEM), as indicated in the legends of each figure. Student's unpaired t test was performed to assess statistical differences between two groups, and comparisons for more than two groups were performed using one-way ANOVA. Finally, differences between two groups under two different factors were examined by a two-way ANOVA. In all analyses, a p value of $p < 0.05$ was considered significant.

Table 1:

Gene	Species	Sequence	
<i>Cyclophilin</i>	Human/ Mouse	Forward	GCATACGGGTCCTGGCATCTTGTCC
		Reverse	ATGGTGATCTTCTTGCTGGTCTTGC
<i>FAT10</i>	Human	Forward	CAGAGATGGCTCCCAATGCT
		Reverse	TTGGGAAATCATCAGAAGAT
<i>Fat10</i>	Mouse	Forward	TTCTGTCCGCACCTGTGTTG
		Reverse	TGCCCTCGTTTTTGGACTC
<i>PPARα</i>	Human	Forward	GGTGGACACGGAAAGCCCAC
		Reverse	GGACCACAGGATAAGTCACC
<i>Ppara</i>	Mouse	Forward	ATCGCGTACGGCAATGGCTTTA
		Reverse	CAGGCCGATCTCCACAGCAAATTA
<i>HMGCS2</i>	Human	Forward	AGGCTGGAAGTAGGCACTGA
		Reverse	GTGGGACGAGCATTACCACT
<i>Hmgcs2</i>	Mouse	Forward	TGGCCATGTATCTGTTTTGG
		Reverse	TGCAAGTGAAGAGAGCGATG
<i>PDK4</i>	Human	Forward	GATGAACCAGCACATTCTTA
		Reverse	GCTACCACATCACAGTTAGG
<i>Cpt1α</i>	Mouse	Forward	TGGTTAACAGCAACTACTACG
		Reverse	GACGAATAGTTTTGAGTTCC
<i>Acadvl</i>	Mouse	Forward	CTCAGTGAAGAACAGGCACAA
		Reverse	CTT GGC AGG GTC ATT CAC TT
<i>Acadl</i>	Mouse	Forward	ATC TTT TCC TCG GAG CAT GA
		Reverse	TTT CTC TGC GAT GTT GAT GC

<i>Acadm</i>	Mouse	Forward	GCC CAG AGA GCT CTA GAC GA
		Reverse	CCA GGC TGC TCT CTG GTA AC
<i>Aco</i>	Mouse	Forward	ACG TCT TGG ATG GTA GTC CG
		Reverse	TAA CGC TGG CTT CGA GTG AG
<i>Cyp4a10</i>	Mouse	Forward	TGA GGG AGA GCT GGA AAA GA
		Reverse	CTG TTG GTG ATC AGG GTG TG
<i>Cyp4a14</i>	Mouse	Forward	TTGCTCACGAGCACACAGAT
		Reverse	TCCTCCATTCTGGCAAACAAGA
<i>Scd1</i>	Mouse	Forward	TTCCCTCCTGCAAGCTCTACACCTG
		Reverse	AGCCGTGCCTTGTAAAGTTCTGTGG

Table 2:

Protein	Application	Reference
Beta-actin	WB	Sigma
HSP90	WB	Santa Cruz
PPAR α	WB, IF, PLA	Santa Cruz
FAT10	WB, CoIP	Millipore
FAT10	IF, PLA	LS Bio
DDK	WB	Origene

References:

- Aichem, A. *et al.* (2010) 'USE1 is a bispecific conjugating enzyme for ubiquitin and FAT10, which FAT10ylates itself in cis', *Nature Communications*. Nature Publishing Group, 1(2). doi: 10.1038/ncomms1012.
- Aichem, A. *et al.* (2012) 'The proteomic analysis of endogenous FAT10 substrates identifies p62 / SQSTM1 as a substrate of FAT10ylation', *Journal of Cell Science*, 53, pp. 4576–4585. doi: 10.1242/jcs.107789.
- Aichem, A. *et al.* (2018) 'The structure of the ubiquitin-like modifier FAT10 reveals an alternative targeting mechanism for proteasomal degradation', *Nature Communications*. Springer US, 9(1), pp. 1–14. doi: 10.1038/s41467-018-05776-3.
- Aichem, A. and Groettrup, M. (2020) 'The ubiquitin-like modifier FAT10 - much more than a proteasome-targeting signal', *Journal of cell science*, 133(14). doi: 10.1242/jcs.246041.
- Asif, S. *et al.* (2022) 'Hmgcs2-mediated ketogenesis modulates high-fat diet-induced hepatosteatosis', *Molecular Metabolism*. The Author(s), 61(April), p. 101494. doi: 10.1016/j.molmet.2022.101494.
- Bantubungi, K. *et al.* (2014) 'Cdkn2a/p16lnk4aregulates fasting-induced hepatic gluconeogenesis through the PKA-CREB-PGC1 α pathway', *Diabetes*, 63(10), pp. 3199–3209. doi: 10.2337/db13-1921.
- Cai, J., Zhang, X. J. and Li, H. (2019) 'The Role of Innate Immune Cells in Nonalcoholic Steatohepatitis', *Hepatology*, 70(3), pp. 1026–1037. doi: 10.1002/hep.30506.
- Chen, Z. *et al.* (2018) 'Ubiquitin - like protein FAT10 regulates DNA damage repair via modification of proliferating cell nuclear antigen', *Molecular Medicine Reports*, pp.

7487–7496. doi: 10.3892/mmr.2018.8843.

Choi, Y., Kim, J. K. and Yoo, J. Y. (2014) 'NFκB and STAT3 synergistically activate the expression of FAT10, a gene counteracting the tumor suppressor p53', *Molecular Oncology*. doi: 10.1016/j.molonc.2014.01.007.

Dali-Youcef, N. *et al.* (2019) 'Interleukin-32 Contributes to Human Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Insulin Resistance', *Hepatology Communications*, 3(9), pp. 1205–1220. doi: 10.1002/hep4.1396/supinfo.

Fan, W. *et al.* (1996) 'Identification of seven new human MHC class I region genes around the HLA-F locus', *Immunogenetics*, 44(2), pp. 97–103. doi: 10.1007/BF02660056.

Ferguson, D. and Finck, B. N. (2021) 'Emerging therapeutic approaches for the treatment of NAFLD and type 2 diabetes mellitus', *Nature Reviews Endocrinology*, 17(8), pp. 484–495. doi: 10.1038/s41574-021-00507-z.

Francque, S. *et al.* (2015) 'PPARα gene expression correlates with severity and histological treatment response in patients with Non-alcoholic Steatohepatitis', *JOURNAL OF HEPATOLOGY*. European Association for the Study of the Liver. doi: 10.1016/j.jhep.2015.02.019.

Galili, T. *et al.* (2018) 'Heatmaply: An R package for creating interactive cluster heatmaps for online publishing', *Bioinformatics*, 34(9), pp. 1600–1602. doi: 10.1093/bioinformatics/btx657.

Gu, Z. *et al.* (2014) 'Circlize implements and enhances circular visualization in R', *Bioinformatics*, 30(19), pp. 2811–2812. doi: 10.1093/bioinformatics/btu393.

Haas, J. T. *et al.* (2019) 'Transcriptional network analysis implicates altered hepatic immune function in NASH development and resolution', *Nature Metabolism*, 1(6), pp.

604–614. doi: 10.1038/s42255-019-0076-1.

Haas, J. T., Francque, S. and Staels, B. (2016) 'Pathophysiology and Mechanisms of Nonalcoholic Fatty Liver Disease', *Annual Review of Physiology*. doi:

10.1146/annurev-physiol-021115-105331.

Hennuyer, N. *et al.* (2016) 'The novel selective PPAR α modulator (SPPARM α) pemafibrate improves dyslipidemia, enhances reverse cholesterol transport and decreases inflammation and atherosclerosis', *Atherosclerosis*, 249, pp. 200–208. doi:

10.1016/j.atherosclerosis.2016.03.003.

Inc., P. T. (2015) *Collaborative data science*. Available at: <https://plot.ly/>.

Ip, E. *et al.* (2004) 'Administration of the Potent PPAR α Agonist, Wy-14,643, Reverses Nutritional Fibrosis and Steatohepatitis in Mice', *Hepatology*, 39(5), pp.

1286–1296. doi: 10.1002/hep.20170.

Jia, Y. *et al.* (2018) 'Different roles of FAT10, FOXO1, and ADRA2A in hepatocellular carcinoma tumorigenesis in patients with alcoholic steatohepatitis (ASH) vs non-alcoholic steatohepatitis (NASH)', *Experimental and Molecular Pathology*. doi:

10.1016/j.yexmp.2018.07.005.

Kalveram, B., Schmidtke, G. and Groettrup, M. (2008) 'The ubiquitin-like modifier FAT10 interacts with HDAC6 and localizes to aggresomes under proteasome inhibition', *Journal of Cell Science*. doi: 10.1242/jcs.035006.

Kersten, S. *et al.* (1999) 'Peroxisome proliferator-activated receptor α mediates the adaptive response to fasting', *Journal of Clinical Investigation*, 103(11), pp. 1489–1498. doi: 10.1172/JCI6223.

Kita, Y. *et al.* (2012) 'Metformin Prevents and Reverses Inflammation in a Non-Diabetic Mouse Model of Nonalcoholic Steatohepatitis', *PLoS ONE*, 7(9). doi:

10.1371/journal.pone.0043056.

Kleiner, D. E. *et al.* (2005) 'Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease', *Hepatology*, 41(6), pp. 1313–1321. doi:

10.1002/hep.20701.

Lalloyer, F. *et al.* (2011) 'Peroxisome proliferator-activated receptor- α gene level differently affects lipid metabolism and inflammation in apolipoprotein E2 knock-in mice', *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 31(7), pp. 1573–1579. doi:

10.1161/ATVBAHA.110.220525.

Leng, L. *et al.* (2014) 'A proteomics strategy for the identification of FAT10-modified sites by mass spectrometry', *Journal of Proteome Research*, 13(1), pp. 268–276. doi:

10.1021/pr400395k.

Li T, Santockyte R, Yu S, Shen RF, Tekle E, Lee CG, Yang DC, C. P. (2011) 'FAT10 modifies p53 and upregulates its transcriptional activity', *Arch Biochem Biophys*. doi:

10.1016/j.abb.2011.02.017.FAT10.

Liu, X. *et al.* (2016) 'The Ubiquitin-like Protein FAT10 Stabilizes eEF1A1 Expression to Promote Tumor Proliferation in a Complex Manner', *Cancer Res.*, pp. 4897–4908.

doi: 10.1158/0008-5472.CAN-15-3118.

Mitra, S., De, A. and Chowdhury, A. (2020) 'Epidemiology of non-alcoholic and alcoholic fatty liver diseases', *Translational Gastroenterology and Hepatology*, 5, pp.

1–17. doi: 10.21037/TGH.2019.09.08.

Montagner, A. *et al.* (2016) 'Liver PPAR α is crucial for whole-body fatty acid homeostasis and is protective against NAFLD', *Gut*, 65(7), pp. 1202–1214. doi:

10.1136/gutjnl-2015-310798.

Montaigne, D., Butruille, L. and Staels, B. (2021) 'PPAR control of metabolism and

cardiovascular functions', *Nature Reviews Cardiology*, 18(12), pp. 809–823. doi: 10.1038/s41569-021-00569-6.

Nguyen, N. T. H. *et al.* (2016) 'Ubiquitin-like modifier FAT10 attenuates RIG-I mediated antiviral signaling by segregating activated RIG-I from its signaling platform', *Scientific Reports*. Nature Publishing Group, 6(October 2015), pp. 1–12. doi: 10.1038/srep23377.

Okishio, S. *et al.* (2020) 'PPAR α agonist and metformin co-treatment ameliorates NASH in mice induced by a choline-deficient, amino acid-defined diet with 45% fat', *Scientific Reports*. Nature Publishing Group UK, 10(1), pp. 1–11. doi: 10.1038/s41598-020-75805-z.

Oscarsson, J. *et al.* (2018) 'Effects of free omega-3 carboxylic acids and fenofibrate on liver fat content in patients with hypertriglyceridemia and non-alcoholic fatty liver disease: A double-blind, randomized, placebo-controlled study', *Journal of Clinical Lipidology*, 12(6), pp. 1390-1403.e4. doi: 10.1016/j.jacl.2018.08.003.

Pawlak, M. *et al.* (2014) 'The transrepressive activity of peroxisome proliferator-activated receptor alpha is necessary and sufficient to prevent liver fibrosis in mice', *Hepatology*, 60(5), pp. 1593–1606. doi: 10.1002/hep.27297.

Pawlak, M., Lefebvre, P. and Staels, B. (2015) 'Molecular mechanism of PPAR α action and its impact on lipid metabolism, inflammation and fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease', *Journal of Hepatology*. European Association for the Study of the Liver, 62(3), pp. 720–733. doi: 10.1016/j.jhep.2014.10.039.

Pineda-Torra, I. *et al.* (2002) 'Characterization of the Human PPAR alpha Promoter: Identification of a Functional Nuclear Response Element', *Molecular Endocrinology*, 16(5), pp. 1013–1028.

Rakhshandehroo, M. *et al.* (2010) 'Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Alpha Target Genes', 2010. doi: 10.1155/2010/612089.

Ratziu, V. *et al.* (2016) 'Elafibranor, an Agonist of the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- α and - δ , Induces Resolution of Nonalcoholic Steatohepatitis Without Fibrosis Worsening', *Gastroenterology*, 150(5), pp. 1147-1159.e5. doi: 10.1053/j.gastro.2016.01.038.

Reznik, N. *et al.* (2019) 'Phenotypic Screen Identifies JAK2 as a Major Regulator of FAT10 Expression', *ACS Chemical Biology*, 14(12), pp. 2538–2545. doi: 10.1021/acscchembio.9b00667.

Ritchie, M. E. *et al.* (2015) 'Limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies', *Nucleic Acids Research*, 43(7), p. e47. doi: 10.1093/nar/gkv007.

Schmidtke, G., Aichele, A. and Groettrup, M. (2014) 'FAT10ylation as a signal for proteasomal degradation', *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*. doi: 10.1016/j.bbamcr.2013.01.009.

Schregle, R. *et al.* (2018) 'The expression profile of the ubiquitin-like modifier FAT10 in immune cells suggests cell type-specific functions', *Immunogenetics*. *Immunogenetics*, 70(7), pp. 429–438. doi: 10.1007/s00251-018-1055-5.

Scientific, T. F. (2018) *Affymetrix Power Tools*. Available at: <https://www.affymetrix.com/support/developer/powertools/changelog/index.html>.

Shiri-Sverdlov, R. *et al.* (2006) 'Early diet-induced non-alcoholic steatohepatitis in APOE2 knock-in mice and its prevention by fibrates', *Journal of Hepatology*, 44(4), pp. 732–741. doi: 10.1016/j.jhep.2005.10.033.

Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, Mukherjee S, Ebert BL, Gillette MA,

Paulovich A, Pomeroy SL, Golub TR, Lander ES, M. J. (2005) 'Gene set enrichment analysis: A knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(43), pp. 15545--15550. doi: 10.3969/j.issn.0372-2112.2018.08.016.

Vandel, J., Gheeraert, C., *et al.* (2020) 'GIANT: galaxy-based tool for interactive analysis of transcriptomic data', *Scientific Reports*. Nature Publishing Group UK, 10(1), pp. 1–13. doi: 10.1038/s41598-020-76769-w.

Vandel, J., Dubois-Chevalier, J., *et al.* (2020) 'Hepatic molecular signatures highlight the sexual dimorphism of Non-Alcoholic SteatoHepatitis (NASH)', *Hepatology*. doi: 10.1002/hep.31312.

Yang, Z. *et al.* (2019) 'Inhibition of neddylation modification by MLN4924 sensitizes hepatocellular carcinoma cells to sorafenib', *Oncology Reports*, 41(6), pp. 3257–3269. doi: 10.3892/or.2019.7098.

Younossi, Z. *et al.* (2018) 'Global burden of NAFLD and NASH: Trends, predictions, risk factors and prevention', *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*. Nature Publishing Group, 15(1), pp. 11–20. doi: 10.1038/nrgastro.2017.109.

Yu, J. *et al.* (2018) 'Overactivated neddylation pathway in human hepatocellular carcinoma', *Cancer Medicine*, 7(7), pp. 3363–3372. doi: 10.1002/cam4.1578.

Yuan, R. *et al.* (2014) 'Ubiquitin-like Protein FAT10 Promotes the Invasion and Metastasis of Hepatocellular Carcinoma by Modifying β -Catenin Degradation', *Cancer Res*. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-14-0284.

Zhang, Y. *et al.* (2021) 'FAT10 promotes hepatocellular carcinoma (HCC) carcinogenesis by mediating P53 degradation and acts as a prognostic indicator of HCC', *Journal of Gastrointestinal Oncology*, 12(4), pp. 1823–1837. doi: 10.21037/jgo-

21-374.

Zubiete-Franco, I. *et al.* (2017) 'Deregulated neddylation in liver fibrosis', *Hepatology*, 65(2), pp. 694–709. doi: 10.1002/hep.28933.

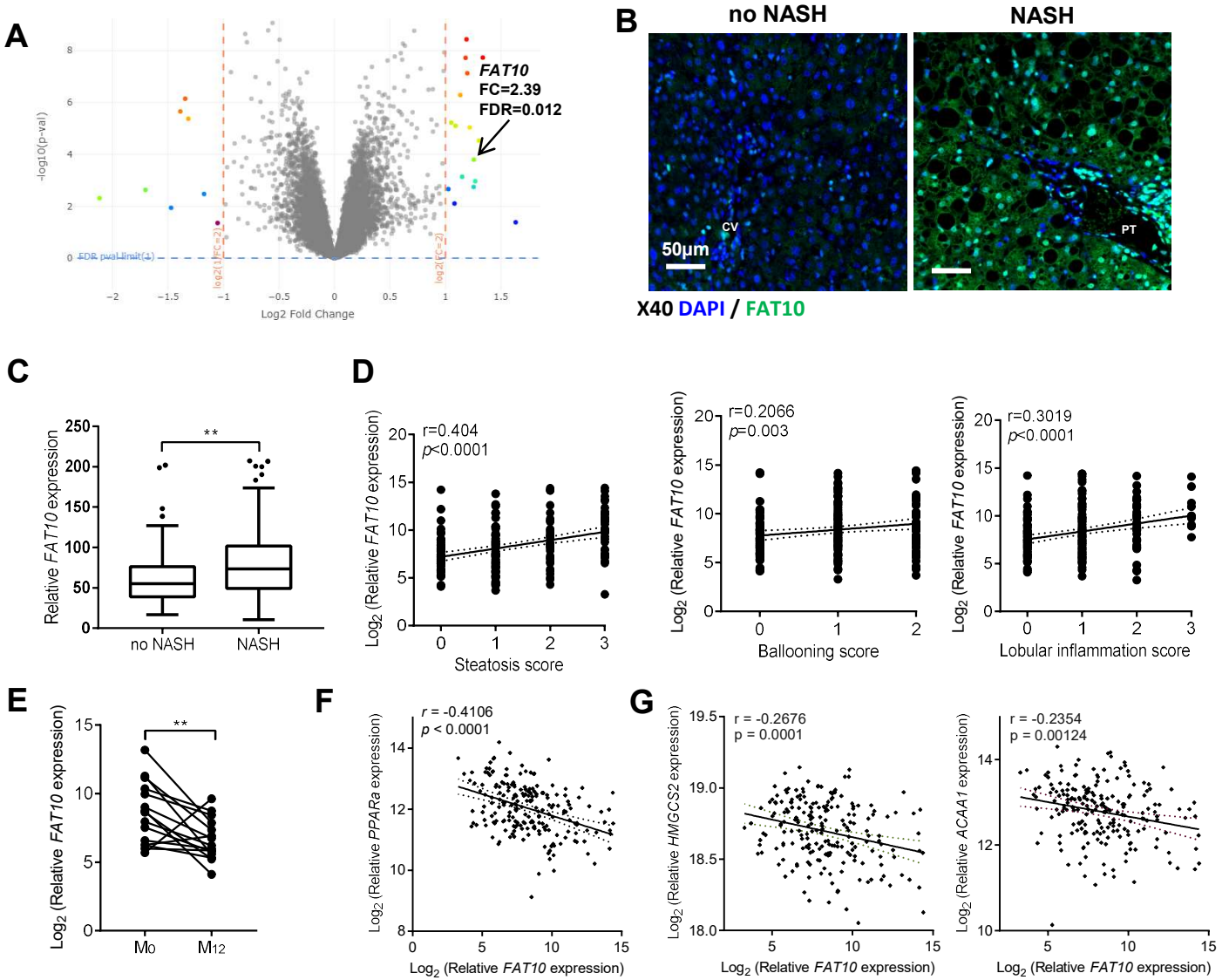
Fig. 1

Figure 1: FAT10 is elevated in NASH patient livers and correlates negatively with PPAR- α expression. Livers from 205 patients were sorted according to histological score (steatosis (S), inflammation (I), fibrosis (F) and ballooning (B)) used to calculate the NAS (S+I+B) into « no NASH » (NAS = 0), or NASH (NAS \geq 3 with S > 1, B > 1 and I > 1) and transcriptomic analysis were performed. **A**) Volcano plots of average log₂ fold-changes versus p-values of all transcripts in RESOLVE patients. The fold change (FC) and false discovery rate (FDR) for FAT10 are indicated. **B**) Representative images for the immunostaining of liver sections from no NASH (S < 33%, I=0, B=0 and F=0, N=5) or NASH (S > 5%, I > 1, B=2 et F < 3, N=5) patients. Nuclear staining in blue with DAPI and FAT10 staining in green enhanced by tyramide detection. The central veins (CV) and portal triads (PT) are indicated. Scale bar = 50 μ m. **C**) FAT10 gene expression was measured in livers of patients with vs without histologically diagnosed NASH (data are represented as box and whiskers in Tukey style, p-value for Healthy vs NASH ** p<0,01), **D**) each histological grades and **E**) before and one year after treatment (p-value for M₀ vs M₁₂ ** p<0.01). Correlation between FAT10 and **F**) PPAR α expression or **G**) some of its target genes. The correlations are linear regressions, the p-values, p, and the correlation coefficient, r, are indicated. The best fit curve is shown with a line and the 95% confidence bands are represented with a dashed line.

Fig. 2

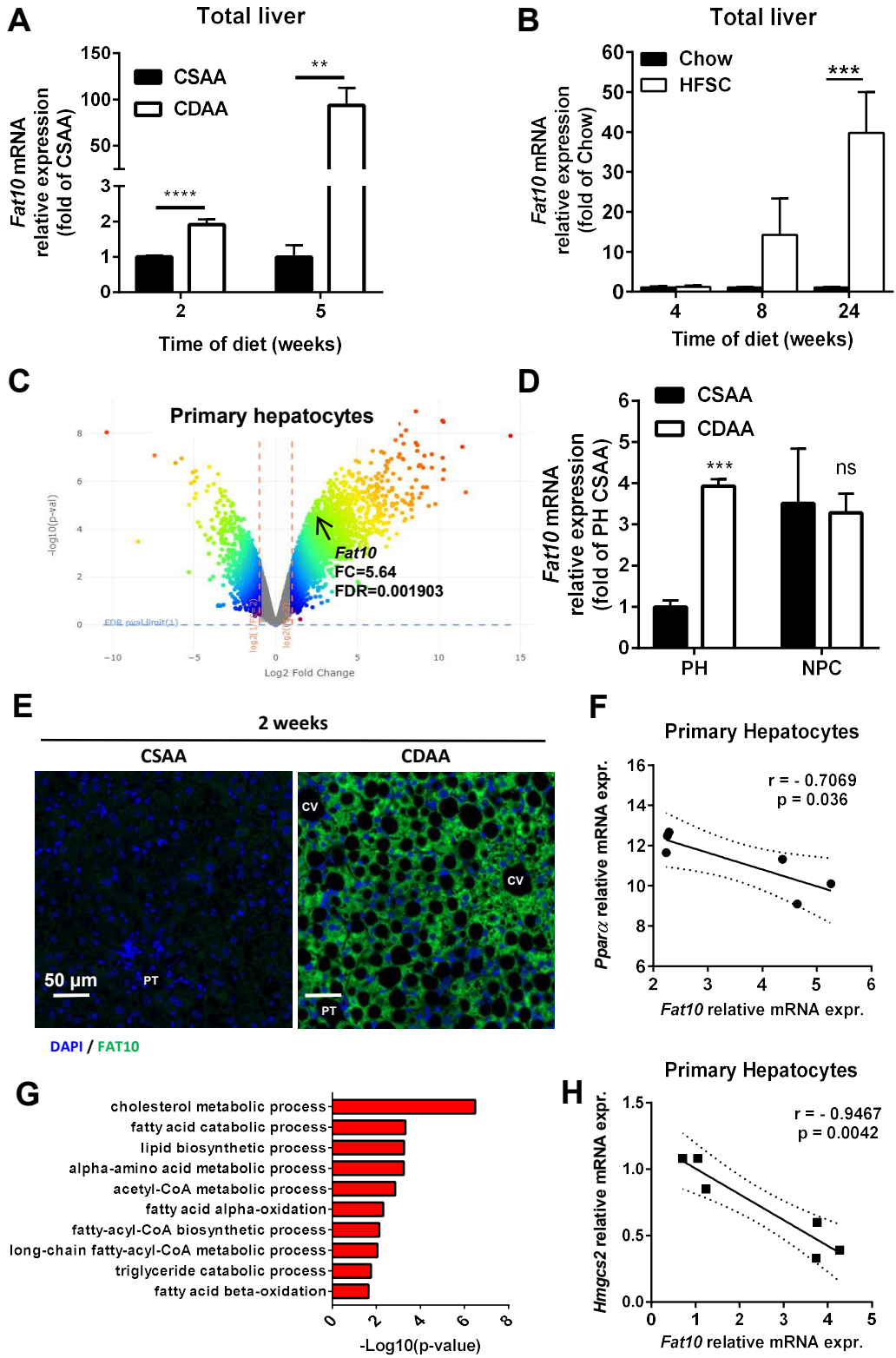


Figure 2: Fat10 is overexpressed in hepatocytes and correlates negatively with Ppara during NASH development in murine livers.

Male mice were fed with a choline deficient diet enriched with 1% cholesterol, glucose and fructose (CDAA) or a control diet (CSAA) during 2 weeks (CSAA N=4 and CDAA N=4) or 5 weeks (CSAA N=5 and CDAA N=7) and total livers or primary hepatocytes (PH) and non-parenchymal cells (NPC; CSAA N=3 and CDAA N=3, only for 2 weeks) were collected. **A)** Fat10 gene expression in total livers of mice after 2 and 5 weeks of diet measured by qPCR. **B)** Fat10 gene expression on mice total livers from male mice fed with a high fat diet supplemented with sucrose and cholesterol (HFSC) or a chow diet (CD) during 4 (CD N=5 and HFHCHS N=10), 8 (CD N=8 and HFHCHS N=8), and 24 weeks (CD N=10 and HFHCHS N=11) (Haas JT, et al., Nat Metab., 2019). **C)** Volcano plot of PH from CSAA vs CDAA mice after 2 weeks of diet. **D)** Fat10 gene expression in PH or NPC of CSAA and CDAA mice after 2 weeks of diet measured by qPCR. **E)** Representative images for the immunofluorescence of the livers of mice after 2 weeks of CSAA or CDAA. Nuclear staining in blue with DAPI and Fat10 staining in green enhanced by tyramide detection. The central veins (CV) and portal triads (PT) are indicated. Scale bar = 50µm. **F)** Correlation between Fat10 and Ppara expression in the PH isolated from mice under 2 weeks of diet obtained from transcriptomic data. The correlation is a linear regression, the p-value and correlation coefficient r are indicated. The best fit curve is shown with a line and the 95% confidence bands are represented with a dashed line. **G)** Gene ontology terms enrichment for genes that are negatively correlated to Fat10 expression in primary hepatocytes isolated from mice under 2 weeks of diet obtained from transcriptomic data. **H)** Correlation between Fat10 and Hmgcs2 expression in the PH isolated from mice under 2 weeks of diet obtained from transcriptomic data. The correlation is a linear regression, the p-value and correlation coefficient r are indicated. The best fit curve is shown with a line and the 95% confidence bands are represented with a dashed line. .

Mean values are indicated ± SEM and with unpaired t-test or two-way ANOVA (**** p<0.0001, *** p<0.001, and ** p<0.01)

Fig. 3

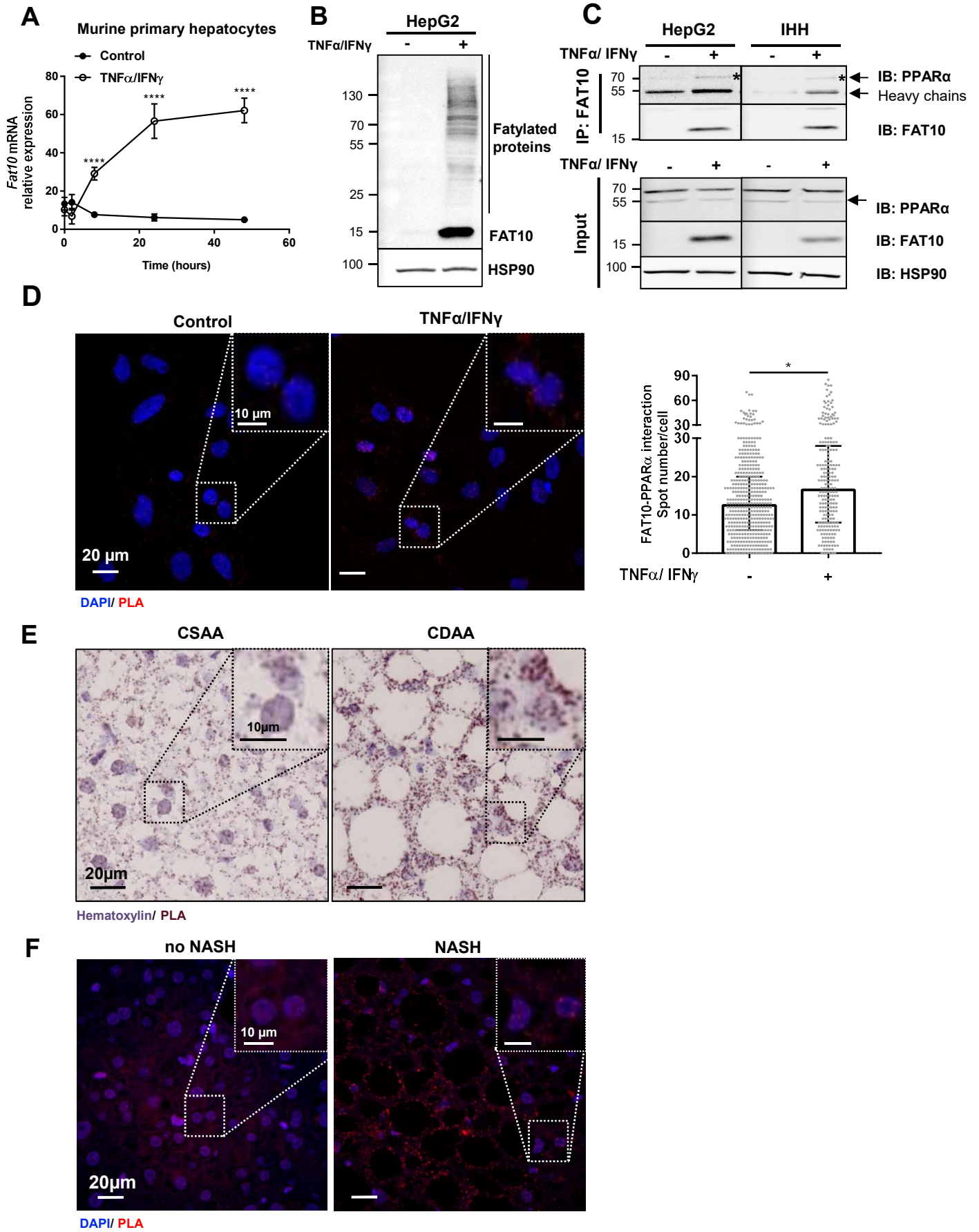


Figure 3: FAT10 interacts with PPAR α in human and murine hepatocytes. **A)** *Fat10* mRNA gene expression measured by qPCR for murine primary hepatocytes treated with murine TNF α (50ng/mL) and IFN γ (10ng/mL) (TNF α /IFN γ) or with sterile water (control) during 8 hours, 24 hours or 48 hours. Values are mean \pm SD analysed by Two-way ANOVA (**** p<0.0001) **B)** Western blot of free FAT10 and FATylated proteins for HepG2 cells treated with human TNF α (50ng/mL) and IFN γ (10ng/mL) (TNF α /IFN γ) or not during 24 hours. **C)** HepG2 and IHH cells were treated TNF α and IFN γ during 24 hours as described before. Cell lysates were subjected to immunoprecipitation with anti-FAT10 antibody. Western blot analysis was performed with antibodies reactive against PPAR α or FAT10. HSP90 was used as a loading control. Upper panels show the immunoprecipitated proteins and lower panels show the total protein expression in the cell lysates (Input). The asterisks mark bands corresponding to the FAT10/ PPAR α complexes. Representative images for the Proximity Ligation Assay (PLA) performed on **D)** HepG2 cells treated or not with TNF α / IFN γ during 24 hours and quantified with Image J represented as median with interquartile range analysed by unpaired t-test (* p<0.05), **E)** liver sections from mice fed with CSAA (N=5) or CDAA (N=7) during 2 weeks and **F)** liver sections from no NASH (S < 33%, I, B and F=0, N=5) or NASH (S > 5%, I > 1, B=2 et F <3, N=10) patients from the RESOLVE cohort. Images are represented full (scale bar = 20 μ m) with a zoom on a selected representative zone (scale bar = 10 μ m).

Fig. 4

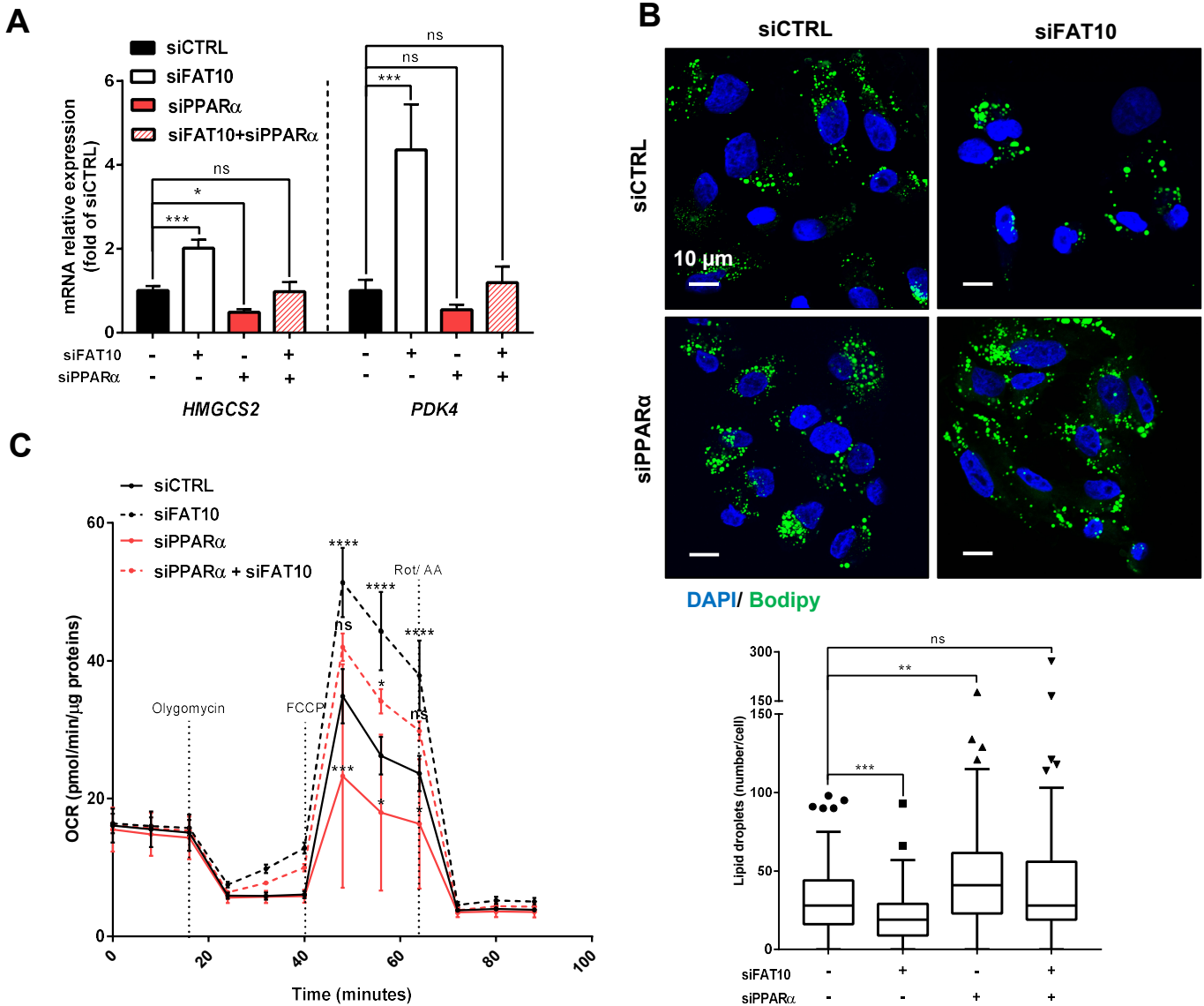


Figure 4: FAT10 silencing enhances PPAR α regulation of lipid metabolism in human hepatocytes. HepG2 cells were transfected with a siRNA control (siCTRL) or a siRNA targeting FAT10 (siFAT10) with or without a siRNA targeting PPAR α (siPPAR α) during 24 hours and then treated with human TNF α (50ng/mL) and IFN γ (10ng/mL) (TNF α /IFN γ) during 24 hours. **A**) *HMGCS2* and *PDK4* mRNA gene expression measured by qPCR. Values are mean \pm SEM analysed by two-way ANOVA (siCTRL vs siRNA: *** $p < 0.001$, * $p < 0.05$, ns $p > 0.05$) **B**) Representative images of BODIPY 493/503 staining of neutral lipids (scale bar = 20 μ m) with the quantification of lipid droplet per cell using the spot detection plug-in of the Icy software. **C**) Oxygen Consumption Rate (OCR) in HepG2 cells transfected with either siCTRL or siFAT10 with or without siPPAR α for 48 hours, and incubated for 1 hour in Seahorse assay media complemented with 1mM pyruvate, 200mM glutamine, and 10mM glucose. OCR was measured over time after treatment with Oligomycin (2 μ M), ATP synthase inhibitor; FCCP (1 μ M), mitochondrial uncoupler; and Rot/AA (0.5 μ M), rotenone and antimycin A, specific inhibitors for ETC complex I and III, respectively. Values are mean \pm SD analysed by two-way ANOVA (siCTRL vs siRNA **** $p < 0.0001$, *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$, ns $p > 0.05$).

Fig. 5

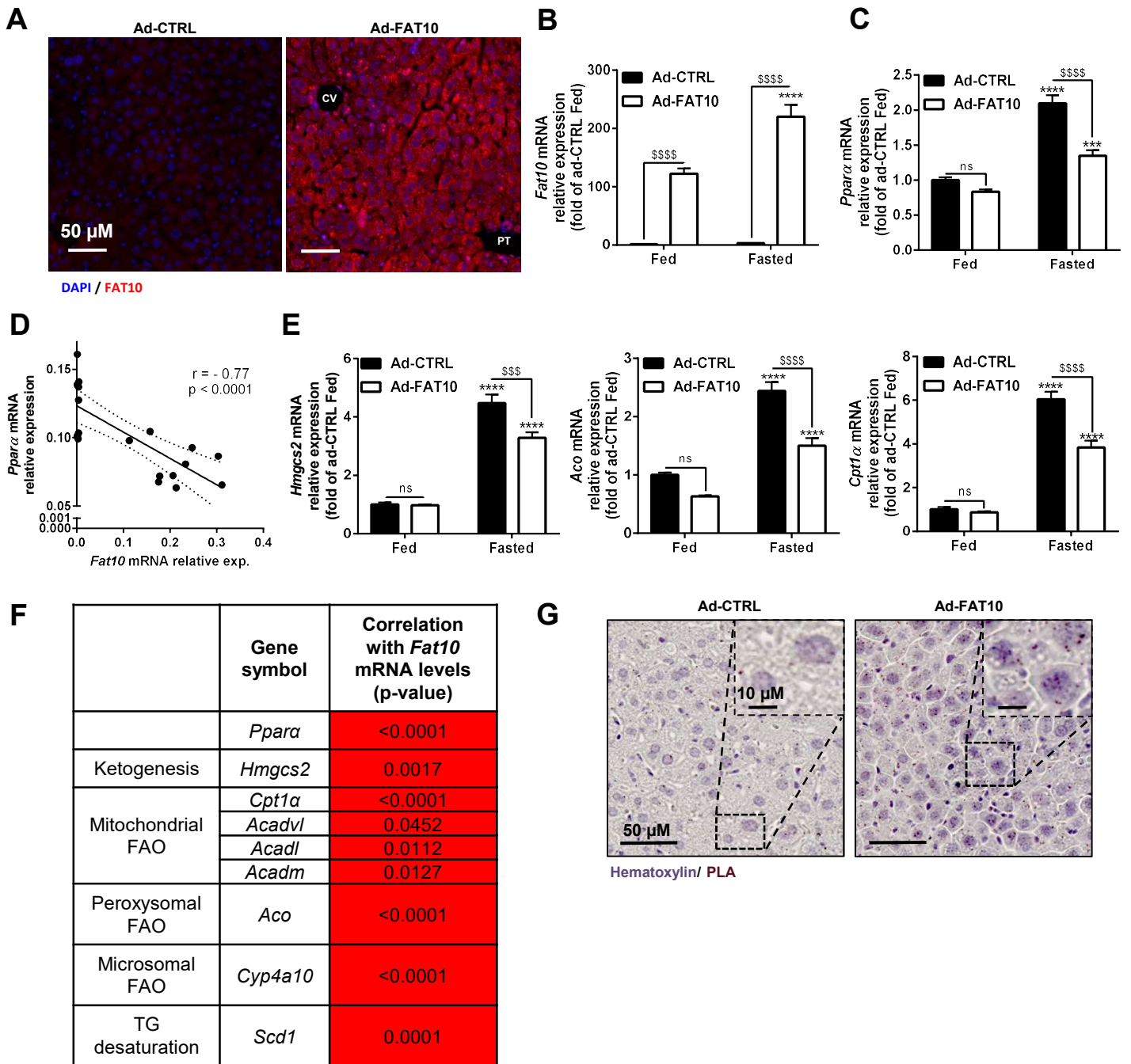
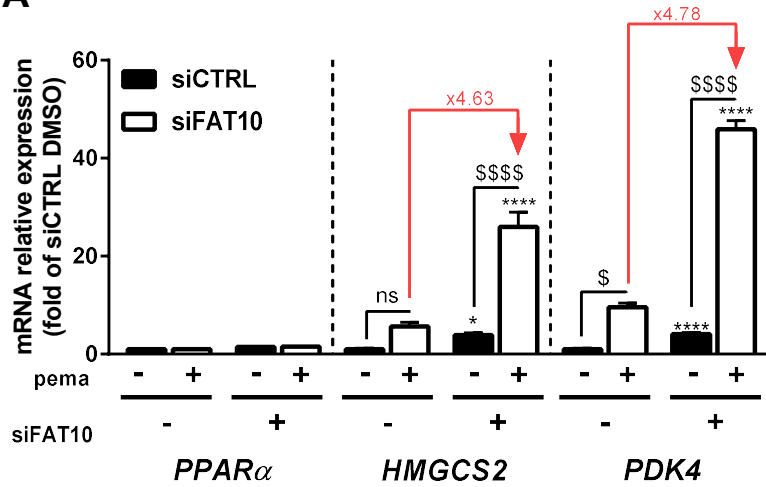


Figure 5: Hepatic Fat10 overexpression inhibits Ppar-alpha activity in response to fasting in vivo. 12-week-old male mice were injected with a control adenovirus (Ad-CTRL) (N=20) or adenovirus FAT10 (Ad-FAT10) (N=19) during 4 days. Then mice were fed ad libitum (Ad-CTRL fed N=10, Ad-FAT10 fed N=9) or fasted during 18h (Ad-CTRL fasted N=10, Ad-FAT10 fasted N=10) before livers and blood were collected. **A)** Immunofluorescence of liver sections of Ad-CTRL (N=5) and Ad-FAT10 (N=5) fasted mice. Nuclear staining in blue with DAPI and Fat10 staining in red enhanced by Tyramide detection. Central vein (CV) and Portal triad (PT) are indicated. Scale bar = 50µm. **B)** *Fat10* and **C)** *Ppara* relative mRNA expressions measured by qPCR. **D)** Correlation between *Fat10* and *Ppar-alpha* expressions in total livers of fasted mice. The correlation is a linear regression, the p-value and correlation coefficient r are indicated. The best fit curve is shown with a line and the 95% confidence bands are represented with a dashed line. **E)** *Hmgcs2*, *Cpt1a* and *Aco* mRNA relative expressions measured by qPCR. **F)** Correlation between *Fat10* and *Ppar-alpha* target gene expressions in total livers of fasted mice. The correlations are linear regressions, p-value are indicated and colored in red (negative correlation coefficient) or in green (positive correlation coefficient). **G)** Representative images of the proximity ligation assay (PLA) performed on liver sections of Ad-CTRL (N=5) and Ad-FAT10 (N=5) fasted mice by immunohistochemistry. Nuclear staining in blue with hematoxylin and Fat10/PPAR α interaction detection in red. Scale bar = 50µm. Values are mean \pm SD analysed by two-way ANOVA (Ad-CTRL vs Ad-FAT10 \$\$\$\$ p<0.0001, \$\$\$ p<0.001. Fed vs Fasted **** p<0.0001, *** p<0.001).

Fig. 6

A



B

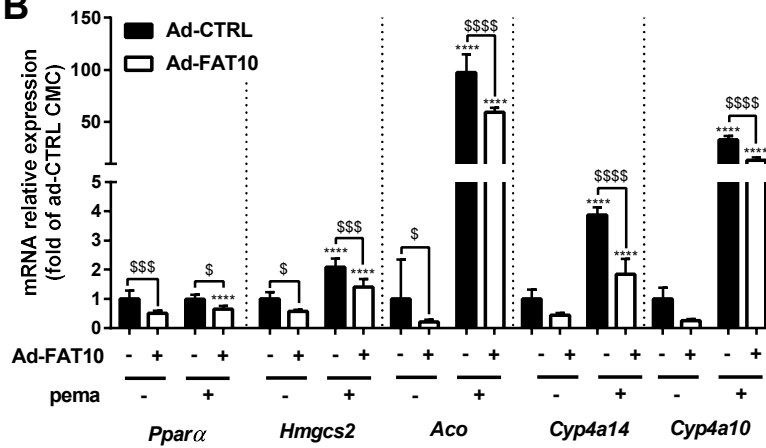
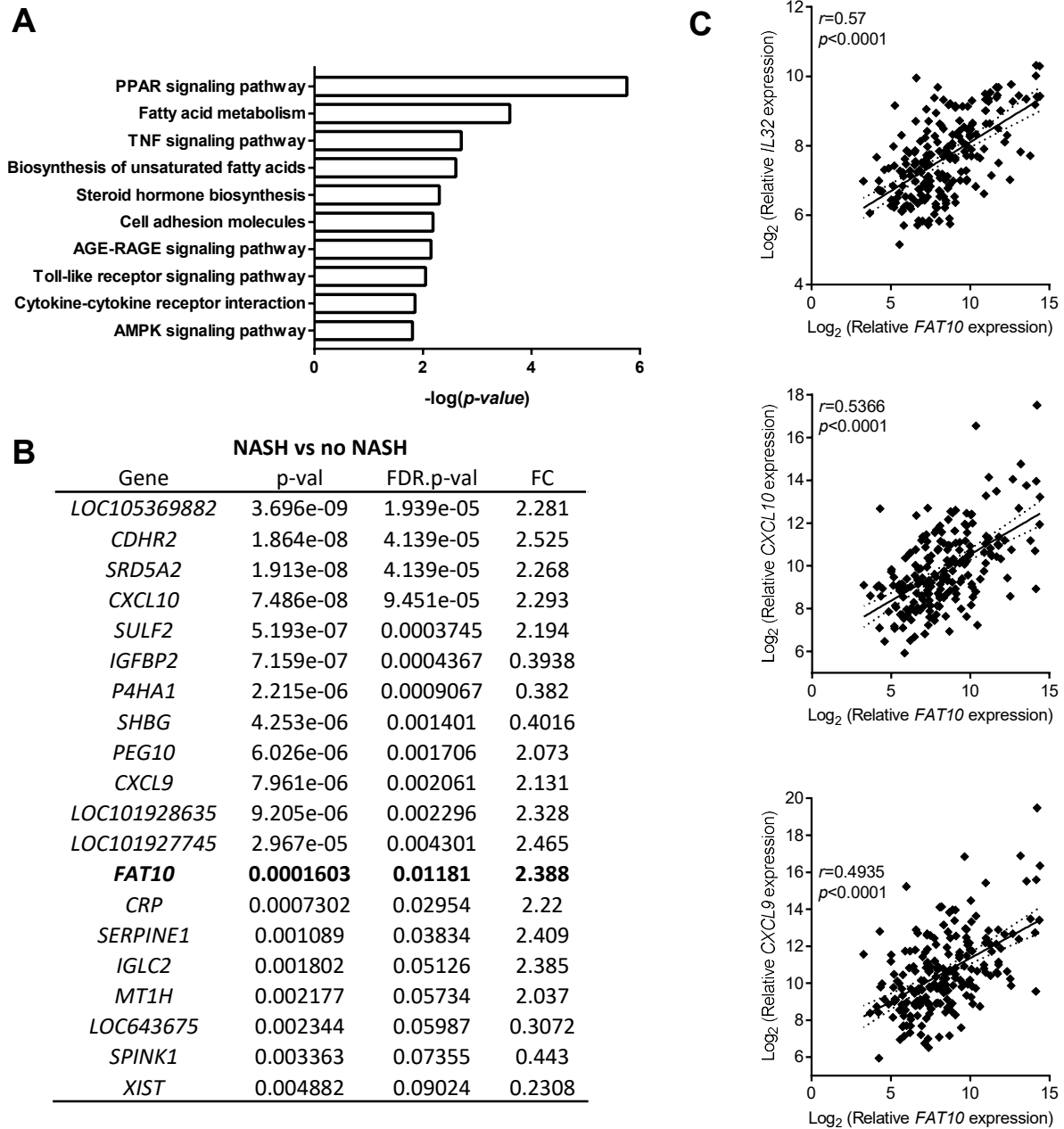


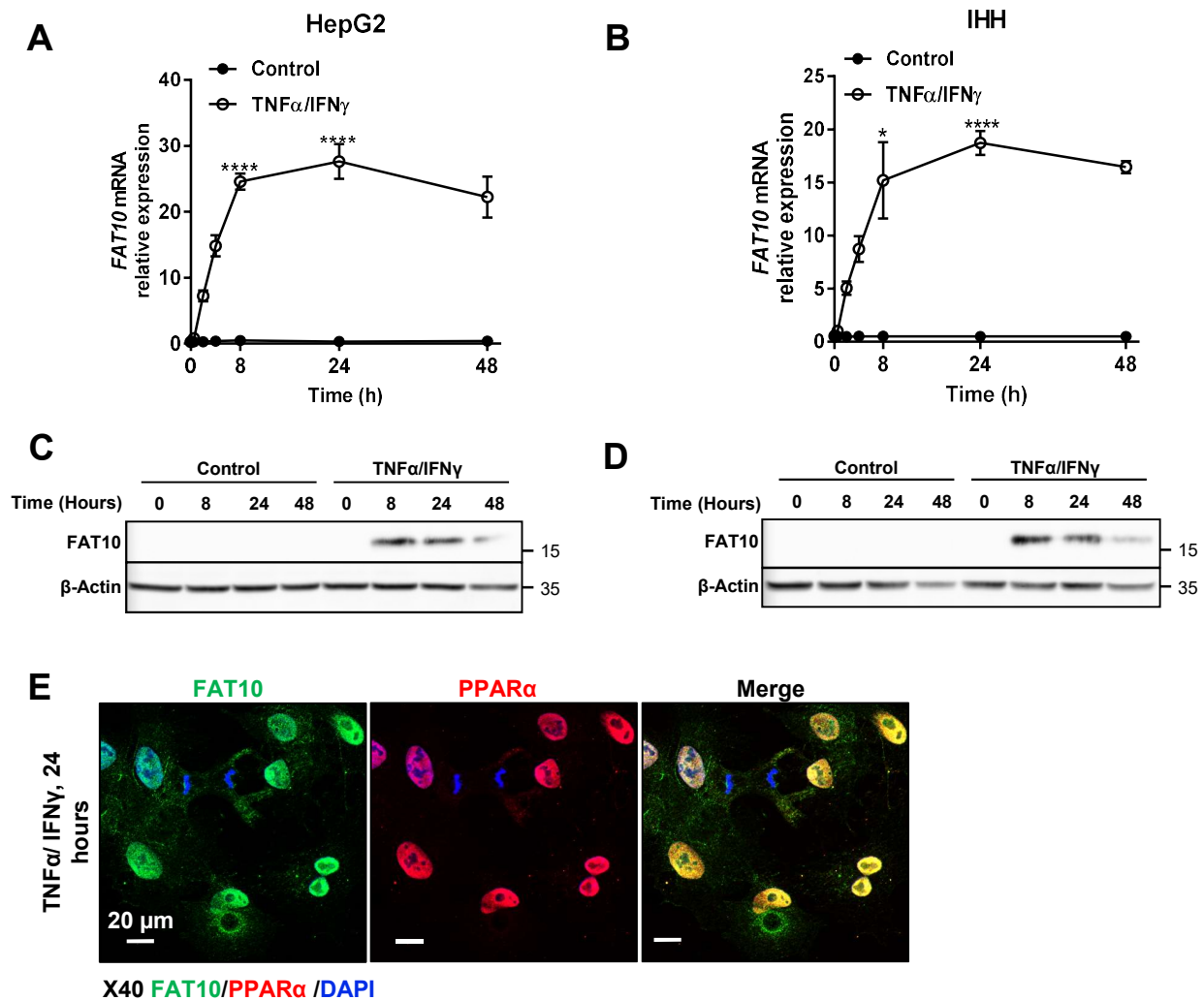
Figure 6: FAT10 impairs the PPAR-alpha agonist response in vitro and in vivo. A) HepG2 cells were transfected with a siRNA control (siCTRL) or a siRNA targeting FAT10 (siFAT10) during 24 hours and then treated with human TNF α (50ng/mL) and IFN γ (10ng/mL) (TNF α /IFN γ) during 24 more hours. The evening prior to the assay, cells were treated with 1 μ M pema (pema) or DMSO. *PPAR α* , *HMGCS2* and *PDK4* mRNA gene expression measured by qPCR and induction fold by pema between siCTRL and siFAT10 are indicated with red arrows. Values are mean \pm SD analysed by two-way ANOVA (DMSO vs pema: **** p<0.0001, ** p<0.01, * p<0.05 with Pema induction fold indicated above the bars. siCTRL vs siFAT10 **** p<0.0001, \$\$\$ p<0.001, \$ p<0.05, ns p>0.05). **B)** 12-week-old male mice were injected with a control adenovirus (Ad-CTRL) (N=11) or adenovirus FAT10 (Ad-FAT10) (N=11) during 4 days. Then mice were orally treated with pema (1mpk. Ad-CTRL pema N=6 and Ad-FAT10 pema N=5) or control CMC (Ad-CTRL CMC N=5 and Ad-FAT10 CMC N=6) on the evening of the 4th day and the morning of the 5th day. Then they were fasted during 5 hours before livers and blood were collected. *Ppara*, *Hmgcs2*, *Pdk4*, *Aco*, *Cyp4a14* and *Cyp4a10* relative mRNA expressions measured by qPCR. Values are mean \pm SD analysed by two-way ANOVA (Ad-CTRL vs Ad-FAT10 **** p<0.0001, *** p<0.001, * p<0.05. CMC vs Pema **** p<0.0001).

Supp. Fig. 1



Supplementary Fig. 1: FAT10 is elevated in NASH patient livers and correlates positively with pro-inflammatory genes. **A)** Gene ontology terms enrichment for genes in the livers of NASH vs no NASH patients. **B)** Top 20 genes enriched in the livers of NASH patients (N=129) compared to no NASH (N=76) **C)** Correlation between *FAT10* and *IL32*, *CXCL10* and *CXCL9* expressions. The correlations are linear regressions, the p-values and the correlation coefficient *r* are indicated. The best fit curve is shown with a line and the 95% confidence bands are represented with a dashed line.

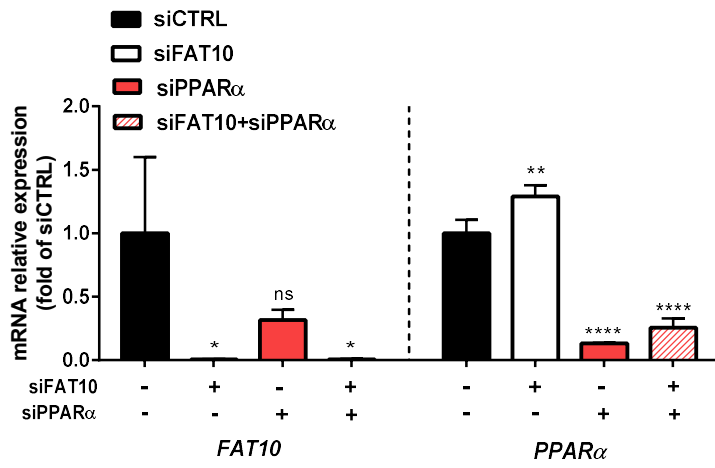
Supp. Fig. 2



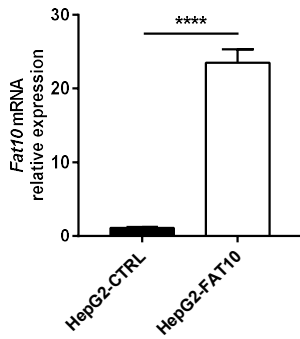
Supplementary Fig. 2: FAT10 is induced by cytokines in hepatocytes and colocalizes with PPAR α . *Fat10* mRNA gene expression measured by qPCR over time for **A**) HepG2 or **B**) IHH treated with human TNF α (50ng/mL) and IFN γ (10ng/mL) (TNF α /IFN γ) or untreated (NT). Values are mean \pm SD analysed by Two-way ANOVA (**** $p < 0.0001$, * $p < 0.5$). Western blot for FAT10 in **C**) HepG2 and **D**) IHH cells treated with TNF α /IFN γ or untreated (NT) as described before. **E**) Immunofluorescence of HepG2 cells treated with TNF α /IFN γ during 24 hours. Nuclear staining in blue with DAPI, Fat10 staining in green and PPAR α staining in red. Scale bar = 20 μ m.

Supp. Fig. 3

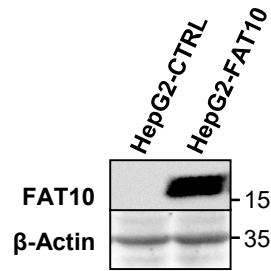
A



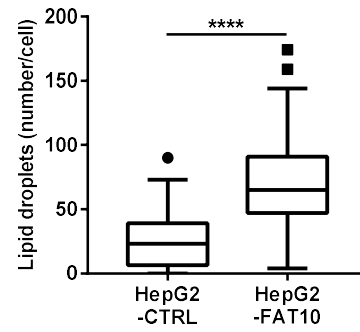
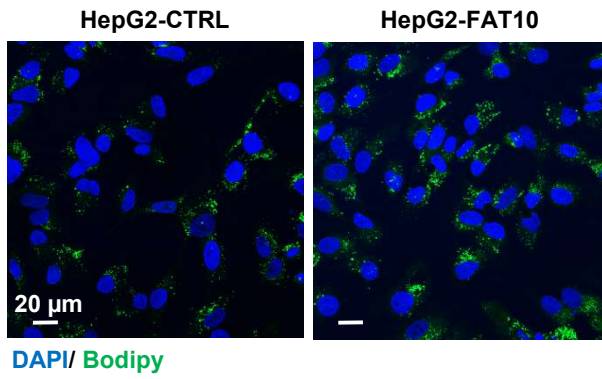
B



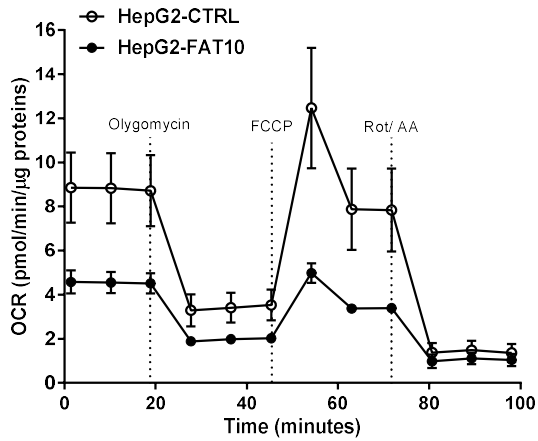
C



D

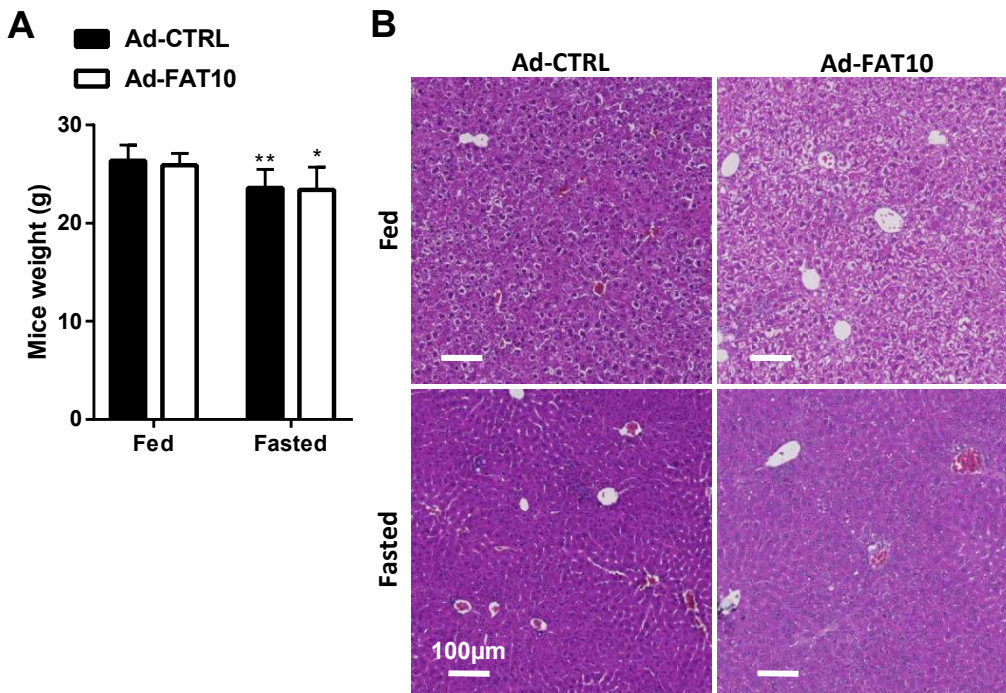


E



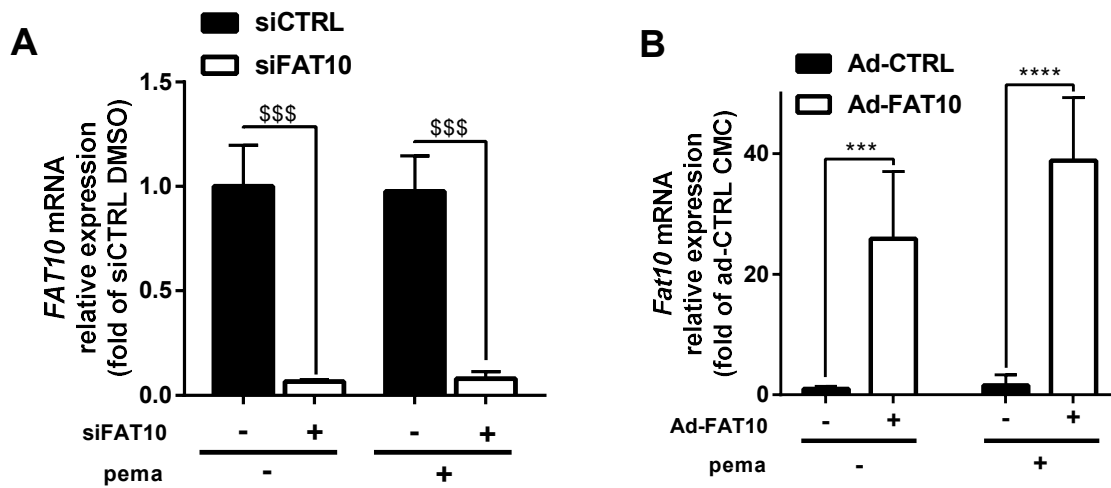
Supplementary Fig. 3: FAT10 overexpressing cells accumulate lipids and have an impaired mitochondrial respiration. HepG2 cells were transfected with a siRNA control (siCTRL) or a siRNA targeting FAT10 (siFAT10) with or without a siRNA targeting PPAR-alpha (siPPAR α) during 24 hours and then treated with human TNF α (50ng/mL) and IFN γ (10ng/mL) (TNF α /IFN γ) during 24 more hours. **A)** *FAT10* and *PPAR α* mRNA gene expression measured by qPCR. Values are mean \pm SEM analysed by Two-way ANOVA (siCTRL vs siRNA: **** p<0.0001, *** p<0.001, ** p<0.01, * p<0.05, ns non-significant). HepG2 cells overexpressing stably FAT10 were obtained after an infection with a lentivirus FAT10 (HepG2-FAT10) or a lentivirus control (HepG2-CTRL) as described in method. **B)** *FAT10* mRNA expression measured by qPCR and **C)** protein expression measured by Western Blot. **D)** Representative images of BODIPY 493/503 staining of neutral lipids (scale bar = 20 μ m) with the quantification of lipid droplet per cell using the spot detection plug-in of the Icy software (HepG2-CTRL vs HepG2-FAT10: **** p<0.0001, ns non-significant; siFAT10+siPPAR α vs siRNA: $\mu\mu\mu\mu$ p<0.0001. NT vs TNF α /IFN γ \$\$\$\$ p<0.0001 and \$\$ p<0.01) **E)** Oxygen Consumption Rate (OCR) in HepG2-FAT10 or HepG2-CTRL cells incubated for 1 hour in Seahorse assay media complemented with 1mM pyruvate, 2mM glutamine, and 10mM glucose. OCR was measured over time after treatment with Oligomycin (2 μ M), ATP synthase inhibitor; FCCP (1 μ M), mitochondrial uncoupler; and Rot/AA (0.5 μ M), rotenone and antimycin A, specific inhibitors for ETC complex I and III, respectively. Values are mean \pm SD analysed by two-way ANOVA (siCTRL vs siRNA **** p<0.0001, *** p<0.001, ** p<0.01, * p<0.05, ns non-significant).

Supp. Fig. 4



Supplementary Fig. 4: Hepatic Fat10 overexpression does not affect mice body weight or liver histology. 12-week-old male mice were injected with a control adenovirus (Ad-CTRL) (N=20) or adenovirus FAT10 (Ad-FAT10) (N=19) during 4 days. Then mice were fed ad libitum (Ad-CTRL fed N=10, Ad-FAT10 fed N=9) or fasted during 18 hours (Ad-CTRL fasted N=10, Ad-FAT10 fasted N=10) before liver and blood were taken. **A)** Mice body weight. **D)** Representative liver hematoxylin and eosin (H&E) stains for each group. Scale bar = 100 µm. Values are mean ± SD analysed by two-way ANOVA (Fed vs Fasted ** p<0.01, * p<0.05).

Supp. Fig. 5



Supplementary Fig. 5: FAT10 expression is not modulated by pema fibrate treatment nor *in vitro* neither *in vivo*. **A)** FAT10 mRNA expression measured by qPCR in HepG2 cells were transfected with a siRNA control (siCTRL) or a siRNA targeting FAT10 (siFAT10) during 24 hours and treated with human TNF α (50ng/mL) and IFN γ (10ng/mL) (TNF α /IFN γ) during 24 more hours. The evening prior to the assay, cells were treated with 1 μ M pema fibrate (pema) or DMSO. Values are mean \pm SD analysed by two-way ANOVA (siCTRL vs siFAT10: \$\$\$ p<0.001). **B)** *Fat10* mRNA expression measured by qPCR in the livers of 12-week-old male mice were injected with a control adenovirus (Ad-CTRL) (N=11) or adenovirus FAT10 (Ad-FAT10) (N=11) during 4 days. This mice were orally treated with pema fibrate (1mpk. Ad-CTRL pema N=6 and Ad-FAT10 pema N=5) or control CMC (Ad-CTRL CMC N=5 and Ad-FAT10 CMC N=6) on the evening of the 4th day and the morning of the 5th day. Then they were fasted during 5 hours before liver and blood were taken. Values are mean \pm SD analysed by two-way ANOVA (Ad-CTRL vs Ad-FAT10 **** p<0.0001 and *** p<0.001).