



HAL
open science

Rôle de l'Apolipoprotéine F dans le métabolisme des lipides : impact sur le développement de la stéatose hépatique non alcoolique

Audrey Deprince

► **To cite this version:**

Audrey Deprince. Rôle de l'Apolipoprotéine F dans le métabolisme des lipides : impact sur le développement de la stéatose hépatique non alcoolique. Médecine humaine et pathologie. Université de Lille, 2021. Français. NNT : 2021LILUS063 . tel-04701993

HAL Id: tel-04701993

<https://theses.hal.science/tel-04701993v1>

Submitted on 19 Sep 2024

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.

THESE DE DOCTORAT D'UNIVERSITE

Domaine scientifique : Biologie, Médecine, Santé
Spécialité : Physiologie, Biologie des organismes, populations,
interactions

Présentée et soutenue publiquement par

Audrey DEPRINCE

Le 10 novembre 2021

**Rôle de l'Apolipoprotéine F dans le métabolisme des lipides :
impact sur le développement de la stéatose hépatique non
alcoolique**

Thèse dirigée par le Dr. Joel HAAS et le Pr. Bart STAELS

Jury :

Dr. Maryse GUERIN

Rapportrice

Dr. Cédric LE MAY

Rapporteur

Pr. Anne TAILLEUX

Présidente du jury

Dr. Joel HAAS

Directeur de thèse

Pr. Bart STAELS

Invité

Remerciements

Je souhaite tout d'abord remercier le Pr. Bart Staels, directeur de l'U1011, pour m'avoir donné l'opportunité de réaliser ma thèse dans son laboratoire et de l'avoir co-encadrée.

Je tiens à remercier mes rapporteurs, les Dr. Maryse Guérin et Cédric Le May, pour avoir accepté de faire partie de ce jury de thèse. Je vous suis sincèrement reconnaissante de cet investissement.

J'adresse également mes remerciements au Pr. Anne Tailleux pour avoir accepté de présider ce jury.

Je remercie la Fondation pour la Recherche Médicale qui a financé ma dernière année de thèse.

A mon directeur de thèse, Joel, merci de m'avoir fait confiance pendant ces 5 années. Ce fut un réel plaisir de travailler avec toi. Tu es un excellent encadrant, toujours à l'écoute et d'une patience à toute épreuve. Désolée de ne pas avoir fait plus d'efforts pour les « *Friday in english* » qui n'auront pas duré très longtemps ! Merci pour tous tes conseils, tes encouragements, ta disponibilité. Merci d'avoir su me rassurer pendant les périodes de stress, notamment pour les présentations en congrès, et surtout merci d'avoir su me faire prendre confiance en moi.

Puisqu'une thèse, c'est également de belles rencontres, je souhaiterais remercier toutes les personnes qui ont contribué à faire du laboratoire un lieu chaleureux.

Nathalie, je n'ai pas assez de mots pour te dire à quel point je te remercie. Merci pour toute l'aide que tu m'as apportée aussi bien au niveau des manips (les joies du P2 !) mais aussi pour ton expertise et tous tes précieux conseils qui ont grandement participé à l'évolution de ce projet. Merci d'avoir toujours pris de ton temps pour me rassurer et me conseiller. Merci pour ta gentillesse, ta générosité et, aussi, pour tes supers bons gâteaux ! Un énorme merci également pour ton aide et ton investissement dans la relecture de ce manuscrit.

Marine (notre consœur, pas l'autre !), la plus courageuse d'entre toutes puisque tu as dû me supporter (presque) chaque jour pendant 4 ans. Merci pour ta bonne humeur, ta gentillesse, ton amitié et surtout merci d'avoir toujours rigolé à mes blagues même lorsqu'elles étaient nulles. Tu as toujours été d'un soutien sans faille dans le travail, mais aussi dans ma vie perso. Ma colocataire de bureau m'aura beaucoup manquée pendant cette fin de thèse. Merci pour tous ces bons moments que l'on a partagés au labo autour d'un café, d'un gâteau ou d'une boîte de bonbons (très mauvaise idée..) mais aussi en dehors et que l'on va poursuivre pendant plusieurs années encore j'en suis sûre.

Quentin, tout d'abord, je tiens à te remercier pour ton humour fin et subtil qui nous aura éblouis plus d'une fois (Oh ça vaaaa). Entre les jeux de mots, les titres, les pauses café sont toujours très animées. Bien joué, mais, malgré tes nombreuses tentatives, tu n'auras pas réussi à me monter contre Marine et je reste sa préférée ! Merci d'avoir supporté mon caractère de grosse râleuse depuis le M2 et toujours avec le sourire. Merci pour toutes ces soirées mémorables au Mother, au Velvet... Merci pour ton écoute, ton soutien et tes

encouragements notamment pendant l'écriture de la thèse. Et bon courage car dans peu de temps c'est ton tour et j'espère que, cette fois, je serais dans tes remerciements !

Valentine, alias Valoche la bikeuse, la petite dernière de notre team « café ». Merci d'avoir comblé mes fringales grâce à tes nombreux gâteaux et ta vocation à nourrir le labo. Un demi-merci (parce que ça me fait quand même un peu rire) à ton coloc pour ce merveilleux surnom qui a failli mettre fin à notre amitié. Désolée de t'abandonner pour ta dernière année mais je sais que tu vas assurer et en attendant on pourra toujours se rejoindre au bar! En tout cas, je tiens à te remercier pour ta gentillesse, ton soutien et pour tous les bons moments que l'on a partagés ensemble et que l'on partagera encore.

Emilie, ma copine de potin, merci de m'avoir si bien accueilli au labo (et à votre table le midi !) quand je suis arrivée. Tu as tout de suite su me mettre à l'aise avec ta gentillesse, ton humour, tes miaous.. Tu respire la joie de vivre ! Merci d'avoir toujours pris de ton temps pour m'écouter et répondre à mes nombreuses questions sur les souris. Merci pour tous ces bons moments que l'on a partagés en dehors du labo et qui vont continuer, je l'espère. Je te souhaite le meilleur pour le futur et pour ton petit Jojo aussi.

Viktor, mon petit protégé à qui j'ai tout appris (pour une fois, tu ne peux pas me contredire). Merci pour ta bonne humeur à toute épreuve. Je pense que l'on aura bien fatigué Marine avec nos blagues qui ne font rire que nous. Merci pour ces bons moments le midi, pour tous ces surnoms (Audrey à peu près, Audrey à moitié,..). D'ailleurs, merci de m'avoir rappelé chaque jour que j'ai connu Pasteur en personne !! Ça aura été un plaisir de travailler avec toi pendant ma dernière année de thèse. Prends bien soin de mes pipettes et de notre bébé (ApoF hein !).

Doriane, alias Dori, je suis très heureuse de t'avoir rencontrée pendant ma thèse. Merci pour tous ces bons moments pendant la pause du midi et pendant les pauses cafés. Ta passion pour les baskets n'a d'égale que ta gentillesse ! Je te souhaite bon courage pour la fin de ta thèse (surtout, bon courage pour supporter Viktor toute seule) et je ne dirais plus qu'une chose.. zé partie !

Alexis, cher Maître de la Bourlingue, tu as su laisser une trace ineffable de ton passage dans l'unité. Merci pour ta gentillesse, ta bienveillance, pour tous tes conseils. Merci aussi pour tous ces bons moments que l'on a passés en dehors du lalab. J'espère que tu t'épanouis dans tes nouvelles aventures parisiennes. Je te souhaite le meilleur pour la suite et à bientôt !

Mes supers collègues de bureau, Isa, Charlène et, plus récemment, Marie, merci pour les petites discussions qui permettent de décompresser un peu dans la journée. Isa, merci pour ton accueil au PPARlab dès mon arrivée en M2 et merci pour ton aide sur la relecture des dernières coquilles. Charlène, merci pour ton humour pince-sans-rire que j'aime beaucoup.

Je tiens à remercier toutes les personnes du laboratoire pour ces moments de convivialités et ces bons souvenirs. Yasmine, tu as toujours su trouver les mots justes pour me rassurer. Merci pour ta générosité, ta bienveillance et ta sympathie. Ben, merci pour ton humour excentrique (qui a fortement inspiré Quentin). Aussi bon déconneur que scientifique, merci pour ton aide et tes nombreux conseils. Delphine, merci pour toute l'aide que tu m'as apportée, d'abord en tant qu'enseignante en master puis en tant que collègue sur la fin de

ma thèse. Merci pour toutes nos discussions scientifiques qui m'ont parfois aidée à mettre de l'ordre dans mes résultats. Pelin, thank you for your kindness, your smile and good mood. I wish you good luck for your new adventures in the USA ! Laurent L, merci pour ton humour même s'il est souvent dirigé contre moi (d'ailleurs...désolée de vous avoir battu à la coupe du monde). Lise et Cécilia, merci pour votre gentillesse et ces supers souvenirs du congrès passé avec vous. Sans oublier, Marion, Stéphane, Aurore, Steve, Olivier MC, Laëtitia, Laurent P, Justine, Thara, Pauline et Kevin.

Je voudrais adresser un merci tout particulier aux personnes qui m'ont aidée au cours de cette thèse. Christian, merci pour tous tes conseils concernant la culture cellulaire et la bactériologie, mais surtout merci pour ta gentillesse et pour nos nombreuses discussions philosophiques. Manue, merci pour ton aide sur les dosages au konelab, sur l'HPLC et merci pour ta sympathie. Bruno, merci de m'avoir transmis ton savoir-faire sur les puces à ARN et merci pour les petites anecdotes sur le labo dont toi seul a le secret. Sandrine, Fanny et Eric merci pour votre aide à l'animalerie. Eloïse, merci pour l'aide que tu m'as apportée au début de ma thèse. Eléonore, merci pour toute ton aide pendant les 3 stages que tu as fait avec moi. Tu as été d'une aide précieuse et ça toujours avec le sourire ! Je te souhaite une bonne continuation. Et enfin, Marie-Hélène, merci pour ton aide dans les démarches administratives.

A toutes les personnes de l'unité que je n'ai pas pu citer, merci pour toutes ces années passées ensemble.

Une pensée toute particulière pour toi Barbara.

Je tiens également à remercier toutes les personnes avec qui j'ai collaboré au cours de ce projet. Un merci à l'équipe du PSM-GRITA et en particulier à Mostafa Kouach pour avoir pris le temps de m'expliquer en long et en large la spectrométrie de masse. Merci à Patrick Rensen, et plus particulièrement Sander et Amanda, pour les expériences sur la clairance des VLDL. Un grand merci également à Mikaël Croyal pour les dosages d'apolipoprotéines. Enfin, merci à l'équipe du Dr. Bart van de Sluis pour les souris ApoF-KO.

Je tiens également à remercier mes amis pour avoir su me faire décompresser après les journées au labo. Merci à ma famille qui m'a soutenue tout au long de ma thèse même s'ils n'ont toujours pas compris sur quoi elle porte ! Et enfin, Matthias, merci pour ton soutien au quotidien.

Résumé

Rôle de l'Apolipoprotéine F dans le métabolisme des lipides : impact sur le développement de la stéatose hépatique non alcoolique

La stéatohépatite métabolique (*Non-Alcoholic Fatty Liver Disease*, NAFLD) est une maladie hépatique chronique et progressive incluant plusieurs manifestations cliniques allant de la stéatose hépatique seule à la stéatohépatite (ou NASH). Ces changements dans le foie ont un impact significatif sur la physiologie globale et indiquent un risque important de mortalité par les maladies cardiovasculaires et le carcinome hépatocellulaire. Toutefois, les mécanismes moléculaires conduisant à l'évolution de la NAFLD vers la NASH restent mal connus. Grâce à une analyse transcriptomique non biaisée, nous avons identifié l'Apolipoprotéine F (ApoF) dont l'expression est inversement corrélée avec la stéatose et réduite de 50% chez les patients atteints de NASH. L'ApoF est sécrétée exclusivement par le foie et est associée aux lipoprotéines de haute densité (HDL) et de basse densité (LDL). De précédentes études fonctionnelles ont montré que l'ApoF favorisait le transport inverse du cholestérol chez la souris. Ces résultats suggèrent que l'ApoF pourrait affecter le développement de la NAFLD et/ou de ses complications cardiovasculaires.

Toutefois, le rôle précis de l'ApoF dans le métabolisme des lipoprotéines reste mal connu. Ainsi, au cours de ce projet, nous avons mis en évidence un nouveau rôle de l'ApoF. Nos résultats montrent que la surexpression de l'APOF chez la souris est associée à une diminution des taux plasmatiques de triglycérides (TG) à jeun. Elle favorise à la fois la sécrétion des VLDL et la clairance des particules riches en TG via l'augmentation de leur capture hépatique probablement par l'activation de la voie SREBP2.

Nous avons ensuite cherché à déterminer l'impact de la modulation de l'expression hépatique de l'ApoF sur le développement de la NAFLD chez des souris nourries avec un régime riche en gras supplémenté en sucrose et en cholestérol permettant d'induire la NASH. De manière surprenante, nos résultats montrent que la surexpression de l'APOF hépatique dans le contexte de la NAFLD semble être délétère. Nous observons, dans ce cas, une aggravation de l'inflammation hépatique et des changements défavorables dans les lipides plasmatiques (réduction du HDL-C et augmentation du LDL-C). A l'inverse, la délétion totale de l'ApoF semble protéger du développement de la pathologie. Ainsi, nos résultats suggèrent que la diminution de l'expression de l'APOF hépatique chez les patients atteints de NAFLD pourrait être un mécanisme compensatoire visant à empêcher un effet délétère de l'activité de l'ApoF. Toutefois, des études complémentaires sont indispensables pour confirmer le rôle de l'ApoF dans le développement de la NAFLD.

Mots clés : NAFLD – Apolipoprotéine F - Lipides

Abstract

Role of Apolipoprotein F in lipid metabolism : impact on the development of NAFLD

Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) is a chronic, progressive disease which includes a spectrum of disease states ranging from isolated hepatic steatosis to steatohepatitis (or NASH). These changes in the liver have a significant impact on overall physiology and indicate higher risk of mortality from cardiovascular disease and hepatocellular carcinoma. However, the molecular mechanisms driving NAFLD evolution to NASH remain poorly understood. Through an unbiased transcriptomic analysis, we identified Apolipoprotein F (ApoF) whose expression is inversely correlated with steatosis and reduced ~ 50% in subjects with NASH. ApoF is secreted exclusively from the liver and found associated with high-density (HDL) and low-density lipoprotein (LDL) particles. Previous functional studies of ApoF have shown that ApoF favors reverse cholesterol transport in mice. These results suggest ApoF could affect NAFLD development and/or its cardiovascular complications.

However, the precise role of ApoF in lipoprotein metabolism remains poorly understood. In this project, we have identified a new role for ApoF. Our results show that overexpression of APOF in mice is associated with a decrease in fasting plasma triglycerides (TG) levels by promoting both VLDL secretion and clearance of TG-rich particles via an increase in their hepatic uptake, probably through activation of the SREBP2 pathway.

Subsequently, we sought to determine the impact of modulating hepatic ApoF expression on the development of NAFLD in mice fed with a high fat diet supplemented with sucrose and cholesterol, which induces NASH. Surprisingly, our results show that raising the level of hepatic APOF in the context of NAFLD may rather be deleterious. We observed an aggravation of hepatic inflammation and unfavorable changes in plasma lipids (reduced HDL-C and increased LDL-C) in mice overexpressing APOF compared to GFP after being fed the NASH-inducing diet. Similarly, total deletion of ApoF does not seem to accelerate the development of the disease. Thus, our results suggest that the decrease in hepatic APOF expression in NAFLD patients may be a compensatory mechanism to prevent a deleterious effect of ApoF activity. However, further studies are needed to confirm the role of ApoF in the development of NAFLD.

Key words : NAFLD – Apolipoprotein F - Lipids

Sommaire

REMERCIEMENTS	3
RESUME	7
ABSTRACT	8
SOMMAIRE	9
LISTE DES ABRÉVIATIONS	13
INTRODUCTION	17
PARTIE 1 : LE METABOLISME DES LIPOPROTEINES.....	17
1. PRESENTATION DES LIPOPROTEINES	17
1.1. Définition d'une lipoprotéine.....	17
1.2. Les différentes classes de lipoprotéines.....	17
1.3. Composition lipidique et protéique des sous-classes de lipoprotéines.....	18
2. METABOLISME DES LIPOPROTEINES RICHES EN TG	20
2.1. Synthèse des chylomicrons par l'intestin.....	20
2.2. Synthèse des VLDL par le foie	21
2.3. Métabolisme intravasculaire des lipoprotéines de basse densité	22
2.4. Les récepteurs des lipoprotéines de basse densité	24
2.5. La lipoprotéine (a)	28
3. METABOLISME DES HDL	28
3.1. Synthèse des HDL	28
3.2. Modification intravasculaire des HDL.....	29
3.3. Le transport inverse du cholestérol	30
4. DEREGULATION DU METABOLISME DES LIPOPROTEINES : LA DYSLIPIDEMIE	33
PARTIE 2 : METABOLISME HEPATIQUE ET NAFLD	35
1. ANATOMIE GENERALE DU FOIE	35
1.1. Macroscopique	35
1.2. Microscopique	35
2. LES DIFFERENTES FONCTIONS METABOLIQUES DU FOIE	36
2.1. Le métabolisme glucidique	36
2.2. Le métabolisme lipidique.....	37
3. DEREGULATION DU METABOLISME HEPATIQUE : LE CAS PARTICULIER DE LA NAFLD.....	40
3.1. Les différents stades de la NAFLD	40
3.2. Epidémiologie de la NAFLD et des maladies cardiovasculaires	41
3.3. Physiopathologie	41
3.4. Facteurs génétiques associés au développement de la NAFLD	43
3.5. Développement de la dyslipidémie chez les patients atteints de NAFLD.....	44
3.6. Dérégulation du métabolisme des lipides dans la NAFLD	46
3.7. Traitements de la NASH.....	48
PARTIE 3 : L'APOLIPOPROTEINE F	55
1. GENERALITES SUR L'APOF.....	55
1.1. Structure de l'ApoF.....	55
1.2. Localisation de l'ApoF.....	56

1.3.	<i>Concentration plasmatique de l'ApoF chez l'Homme</i>	56
2.	LES FONCTIONS DE L'APOF.....	57
2.1.	<i>L'ApoF : inhibiteur de la CETP ?</i>	57
2.2.	<i>ApoF et transport inverse du cholestérol</i>	59
2.3.	<i>L'ApoF : inhibiteur de la PLTP ?</i>	60
2.4.	<i>Rôle de l'ApoF sur les tissus périphériques ?</i>	60
3.	REGULATION DE L'APOF.....	61
3.1.	<i>Régulation par PPARα</i>	61
3.2.	<i>Régulation par le cholestérol</i>	62
3.3.	<i>Régulation par l'acide rétinoïque</i>	63
3.4.	<i>Régulation par C/EBPα et ETS</i>	63
4.	IMPLICATION DE L'APOF DANS LES MALADIES METABOLIQUES.....	64
	OBJECTIFS DE L'ETUDE	65
	MATERIELS ET METHODES	67
1.	DONNEES CLINIQUES.....	67
1.1.	<i>Étude ABOS</i>	67
1.2.	<i>Étude RESOLVE</i>	67
2.	MODELES ANIMAUX.....	68
3.	TESTS FONCTIONNELS <i>IN VIVO</i>	69
3.1.	<i>Mesure de la sécrétion hépatique de VLDL-TG</i>	69
3.2.	<i>Mesure de la clairance de TG post-prandiaux</i>	70
3.3.	<i>Mesure de la clairance des particules de type VLDL</i>	70
4.	ETUDES <i>IN VITRO</i>	70
4.1.	<i>Modèles cellulaires</i>	70
4.2.	<i>Mesure de la capture des particules marquées</i>	71
4.3.	<i>Stimulation par des agonistes de récepteurs nucléaires</i>	71
4.4.	<i>Stimulation par l'acide oléique, les LDL, le glucose et le TNF</i>	71
5.	HISTOLOGIE DU FOIE DE SOURIS.....	72
6.	ANALYSES DES LIPIDES ET DES LIPOPROTEINES.....	72
6.1.	<i>Dosage des lipides plasmatiques et hépatiques</i>	72
6.2.	<i>Séparation des lipoprotéines plasmatiques</i>	72
6.3.	<i>Dosage de l'activité de la LPL et de la HL</i>	73
7.	ANALYSE DES PROTEINES.....	73
7.1.	<i>Western blot</i>	73
7.2.	<i>Quantification des apolipoprotéines par LC-MS/MS</i>	74
8.	ANALYSES TRANSCRIPTOMIQUES.....	74
8.1.	<i>Extraction des ARN et RT-qPCR</i>	74
8.2.	<i>Puces à ARN</i>	76
9.	ANALYSES BIOCHIMIQUES.....	76
10.	ANALYSES STATISTIQUES.....	76
	RESULTATS	79
	PARTIE 1 : ETUDE DE LA MODULATION DE L'EXPRESSION DE L'APOF <i>IN VIVO</i> SUR LE METABOLISME DES LIPIDES.....	79
1.	<i>L'expression hépatique de l'APOF corrèle avec la stéatose et la dyslipidémie chez l'Homme</i>	79
2.	<i>Validation du modèle de surexpression de l'APOF</i>	81
3.	<i>La surexpression de l'APOF chez la souris est associée à une réduction des concentrations plasmatiques de TG</i>	82

4.	<i>La surexpression de l'APOF favorise la sécrétion des TG par le foie</i>	84
5.	<i>La réduction aiguë de l'expression de l'ApoF est associée à une diminution de la sécrétion de TG par le foie</i>	85
6.	<i>La surexpression de l'APOF favorise la clairance des remnants en favorisant leur capture par le foie</i>	88
7.	<i>La surexpression de l'APOF active la voie SREBP2</i>	93
8.	<i>La diminution de l'expression de l'APOF diminue la capture des VLDL et des LDL in vitro</i>	96
9.	<i>La surexpression de l'APOF chez les souris APOE2-KI entraîne une accumulation de cholestérol dans les particules LDL</i>	97
10.	<i>Etude des mécanismes de régulation de l'ApoF</i>	98
	<i>Conclusion de la première partie</i>	102
	PARTIE 2 : ROLE DE L'APOF DANS LE DEVELOPPEMENT DE LA NAFLD	103
1.	<i>L'expression hépatique de l'APOF est diminuée dans la NAFLD</i>	103
2.	<i>Mise au point d'un modèle murin de NAFLD</i>	104
3.	<i>Etude de la surexpression de l'APOF dans un modèle murin de NAFLD</i>	105
4.	<i>Influence de la déficience totale de l'ApoF sur le développement de la NAFLD</i>	110
	<i>Conclusion de la seconde partie</i>	113
	DISCUSSION	115
1.	DIFFERENCES ENTRE EFFETS AIGUËS ET CHRONIQUES DE L'APOF DANS LE CONTROLE DU METABOLISME LIPIDIQUE	115
2.	ROLE DE L'APOF DANS LA SECRETION DES VLDL	116
3.	ROLE DE L'APOF DANS LA CLAIRANCE DES REMNANTS	118
3.1.	<i>L'ApoF favorise l'endocytose des remnants ?</i>	118
3.2.	<i>L'ApoF favorise la lipolyse intravasculaire ?</i>	120
3.3.	<i>L'ApoF favorise la capture ou la production intestinale de chylomicrons ?</i>	121
4.	ROLES DE L'APOF DANS LE DEVELOPPEMENT DE LA NAFLD	121
5.	ROLES DE L'APOF DANS LE DEVELOPPEMENT DE L'ATHEROSCLEROSE	124
6.	REGULATION DE L'APOF	125
7.	LIMITES DE CE PROJET	126
8.	CONCLUSION	127
	BIBLIOGRAPHIE	129
	ANNEXES	155
	ANNEXE 1 : COMMUNICATIONS	156
	ANNEXE 2 : REVUE PUBLIEE DANS MOLECULAR METABOLISM ⁸¹	157
	ANNEXE 2 : ARTICLE PUBLIE DANS NATURE METABOLISM ²²¹	193
	ANNEXE 3 : ARTICLE EN PREPARATION POUR SOUMISSION DANS HEPATOLOGY	226

Liste des abréviations

AAV : <i>Adeno-associated virus</i>	CPT1 : <i>Carnitine palmitoyltransferase 1</i>
ABCA1 : <i>ATP-binding cassette 1</i>	CRISPR : <i>Clustered regularly interspaced short palindromic repeats</i>
ABCG1 : <i>ATP binding cassette subfamily G member 1</i>	CYP7A1 : <i>cytochrome P450 family 7 subfamily A member 1</i>
ABOS : <i>Atlas Biologique de l'Obésité Sévère</i>	DAB2 : <i>Disabled-2</i>
ACAT : <i>Acyl-CoA : cholesterol acyltransferase</i>	DAG : <i>Diacylglycérol</i>
ACC : <i>Acetyl-coA carboxylase</i>	DGAT : <i>Diacylglycerol acyltransferase</i>
ALAT : <i>Alanine aminotransférase</i>	Dil : <i>1,10-dioctadécyl-3,3,30,30-tétraméthylindocarbocyanine perchlorate</i>
Ad : <i>Adénovirus</i>	DMSO : <i>Diméthylsulfoxyde</i>
ANGPTLs : <i>Angiopoietin-like proteins</i>	DT2 : <i>Diabète de type 2</i>
ANOVA : <i>Analyse de variance</i>	FABPs : <i>Fatty acid-binding protein</i>
Apo : <i>Apolipoprotéine</i>	FAS : <i>Fatty acid synthase</i>
ApoBEC1 : <i>ApoB mRNA Editing Enzyme Catalytic Subunit 1</i>	FATP : <i>Fatty acid transport protein</i>
ApoE2-KI : <i>ApoE2 knock-in</i>	FCR : <i>Fractional catabolic rate</i>
ApoF-KO : <i>ApoF knock-out</i>	FDFT1 : <i>Farnesyl-diphosphate farnesyltransférase 1</i>
ARNg : <i>ARN guide</i>	FGF : <i>Fibroblast growth factor</i>
ARNm : <i>ARN messenger</i>	FPLC : <i>Fast Protein Liquid Chromatography</i>
ASAT : <i>Aspartate aminotransférase</i>	FXR : <i>Farnesoid X receptor</i>
AUC : <i>Area under the curve</i>	GFP : <i>Green fluorescent protein</i>
AVC : <i>Accident vasculaire cérébral</i>	GLP1 : <i>Glucagon-like peptide-1</i>
BS : <i>Bile salts</i>	GLUT2 : <i>Glucose Transporter Type 2</i>
BSA : <i>Sérum albumine bovine</i>	GPIHBP1 : <i>Glycosylphosphatidylinositol-anchored HDL-binding protein 1</i>
CD36 : <i>Cluster determinant</i>	GSEA : <i>Gene set enrichment analysis</i>
CETP : <i>Cholesteryl ester transfer protein</i>	gWAT : <i>Tissu adipeux blanc gonadique</i>
CH : <i>Cholestérol</i>	HDL : <i>High Density Lipoprotein</i>
ChREBP : <i>Carbohydrate response element-binding protein</i>	HDL-C : <i>HDL-cholestérol</i>
CL : <i>Cholestérol libre</i>	HEK : <i>Human Embryonic Kidney</i>
CM : <i>Chylomicron</i>	
CO : <i>Cholesteryl oleate</i>	

HFHS+chol : *High fat high sucrose + cholesterol*
HL : Lipase hépatique
HMG-CoA : *3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA*
HNF4 : *Hepatocyte nuclear factor 4*
HS : Héparane sulfate
HSPGs : Protéoglycanes à héparane
iBAT : Tissu adipeux brun interscapulaire
IDL : *Intermediate Density Lipoprotein*
IDOL : *Inducible degrader of the LDLR*
IHH : *Immortalized human hepatocytes*
IL-6 : Interleukine 6
IMC : Indice de masse corporel
iWAT : Tissu adipeux inguinal
KI : *Knock-in*
KO : *Knock-out*
LCAT : *Lecithine-cholestérol acyltransferase*
LC/MS-MS : Chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem
LDL : *Low Density Lipoprotein*
LDL-C : LDL-cholestérol
LDLR : Récepteur aux LDL
LDLRAP1 : *LDLR adaptator protein 1*
LDN : Lipogénèse de novo
Lp(a) : Lipoprotéine (a)
LPK : Pyruvate kinase
LPL : Lipoprotéine lipase
LPS : Lipopolysaccharide
LRP : *LDLR related protein*
LTIP : *Lipid transfer inhibitor protein*
LXR : *Liver X receptor*
MAFLD : *Metabolic-associated fatty liver disease*

MAG : Monoacylglycérol
MBOAT7 : *Membrane bound O-acyltransferase domain containing 7*
MRM : *Multiple reaction monitoring*
mTORC1 : *Mechanistic targeting of rapamycin complex 1*
MTTP : *Microsomal triglyceride transfer protein*
NAFLD : *Non alcoholic fatty liver disease*
NAS : *NAFLD activity score*
NASH : *Non-alcoholic steatohepatitis*
NF-κB : *Nuclear factor kappa B*
NPC1L1 : *Niemann-Pick C1-Like Protein 1*
OCA : Acide obéticholique
OS : Oxystérols
P407 : Poloxamère 407
PC7 : *Proprotein convertase 7*
PEPCK : *Phosphoenolpyruvate carboxylase*
PL : Phospholipide
PLTP : *Phospholipid transfer protein*
PNPLA3 : *Patatin like phospholipase domain containing 3*
PPAR : *Peroxisome proliferator activated receptor*
PSCK9 : *Proprotein convertase subtilisin kexin type 9*
RCT : *Reverse cholesterol transport*
RE : Réticulum endoplasmique
RMA : *Robust multichip average*
ROS : Espèce réactive à l'oxygène
RT : Rétrotranscription
RXR : *Retinoid X receptor*
SAF : *Steatosis activity fibrosis*
sBAT : Tissu adipeux brun subscapulaire
sdLDL : *Small dense LDL*

SEM : *Standard error of the mean*
siRNA : *Small interfering RNA*
SR-B1 : *Scavenger receptor B1*
SREBP : *Sterol regulatory element-binding protein*
STAT2 : *Signal transducer and activator of transcription 2*
SVF : *Sérum de veau foetal*
TA : *Tissu adipeux*
TAZ : *Tafazzine*
TC : *Cholestérol total*
TICE : *Excrétion trans-intestinale du cholestérol*

TG : *Triglycéride*
TGSR : *TG secretion rate*
TM6SF2 : *Transmembrane 6 superfamily member 2*
TNF- α : *Tumor necrosis factor α*
TO : *Tri-oléate*
TR- β : *Récepteur β des hormones thyroïdiennes*
TZD : *Thiazolidinediones*
VLDL : *Very Low Density Lipoprotein*
VLDLR : *Récepteur aux VLDL*
WT : *Wild-type*

Introduction

Partie 1 : Le métabolisme des lipoprotéines

1. Présentation des lipoprotéines

1.1. Définition d'une lipoprotéine

De nature hydrophobe, les lipides sont insolubles dans l'eau. Ils sont transportés dans le sang sous forme de particules que l'on appelle des lipoprotéines (**Figure 1**). Les lipoprotéines sont des particules constituées d'un cœur lipidique hydrophobe contenant des triglycérides (TG) et de cholestérol estérifié, entouré d'une couche amphipathique composée de phospholipides, de cholestérol libre et de protéines appelées apolipoprotéines (Apo)¹.

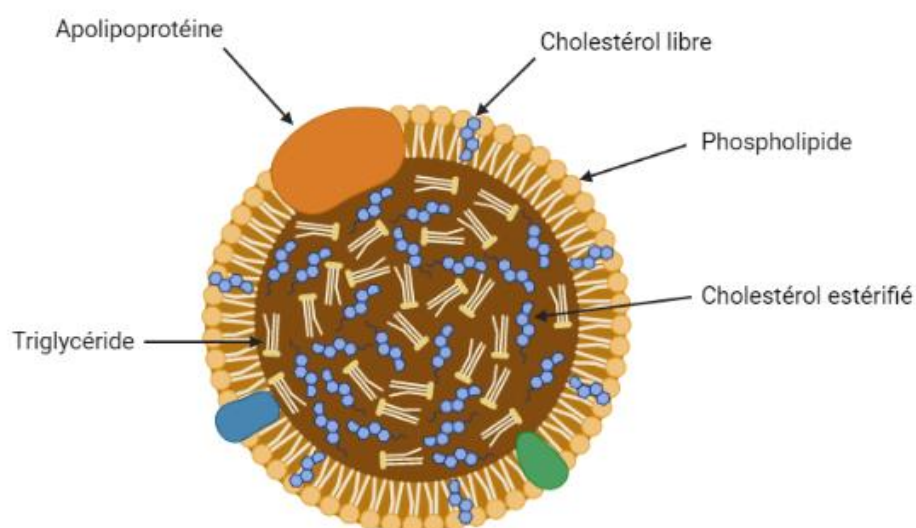


Figure 1 : Schéma d'une lipoprotéine.

1.2. Les différentes classes de lipoprotéines

Il existe plusieurs classes de lipoprotéines caractérisées par leur taille, leur densité, leur composition lipidique et protéique (**Tableau 1**) composées par :

- Les chylomicrons
- Les lipoprotéines de très basse densité ou VLDL (*Very Low Density Lipoprotein*)
- Les lipoprotéines de densité intermédiaire ou IDL (*Intermediate Density Lipoprotein*)
- Les lipoprotéines de basse densité ou LDL (*Low Density Lipoprotein*)
- Les lipoprotéines de haute densité ou HDL (*High Density Lipoprotein*).

Tableau 1 : Classification des lipoprotéines (tableau adapté de Cohen and Fisher, 2013²)

	CM	VLDL	IDL	LDL	HDL	Lp(a)
Densité (g/mL)	<0,95	0,95-1,006	1,006-1,019	1,019-1,063	1,063-1,21	1,055-1,085
Diamètre (nm)	75-1200	30-80	25-35	18-25	5-12	~30
Lipides majoritaires	TG	TG	TG Cholestérol	Cholestérol	Cholestérol	Cholestérol
Apo majoritaires	B48, A1, A4, E, C1, C2, C3	B100, E, C1, C2, C3	B100, E, C1, C2, C3	B100	A1, A2, C1, C2, C3, E	B100, (a)

CM : chylomicrons

1.3. Composition lipidique et protéique des sous-classes de lipoprotéines

Les différentes classes de lipoprotéines se distinguent en partie par leur composition lipidique (**Tableau 1**). Les chylomicrons, synthétisés par l'intestin à partir des lipides alimentaires, sont composés à plus de 80% par des TG et contiennent très peu de cholestérol³. Les VLDL sont également des particules riches en TG. Toutefois, elles sont produites uniquement par le foie et contiennent moins de TG que les chylomicrons (~50% de leur contenu lipidique) et s'enrichissent en cholestérol (~20% du contenu)³. Les particules résiduelles de VLDL ayant subi une première hydrolyse de leurs TG sont appelées les *remnants* de VLDL et représentent une autre catégorie de lipoprotéines : les IDL. Ces particules sont enrichies en cholestérol comparées aux VLDL (~30% de leur contenu lipidique). Toutefois, ces particules conservent une teneur en TG importantes (~30%)². Au contraire, les LDL, dérivées des IDL, sont composées pour moitié de cholestérol et par moins de 10% de TG². Les HDL sont, quant à elles, synthétisées à la fois par l'intestin et le foie⁴. Ces particules contiennent autant de cholestérol que de phospholipides et très peu de TG (<10%)². Enfin, la lipoprotéine (a) (Lp(a)), représente le dernier type de lipoprotéine dont le rôle est mal connu mais qui confère un haut risque cardiovasculaire et dont la composition lipidique est très proche de celle des LDL⁵.

Ces différentes lipoprotéines se différencient également par leur composition protéique. Tout d'abord, la teneur en protéines varie fortement en fonction du type de lipoprotéines, les chylomicrons étant les plus pauvres en protéines (~2%) et les HDL les plus riches (~30% pour les plus grosses particules). La teneur en protéine est ainsi répartie selon l'ordre suivant : Chylomicrons < VLDL < IDL < LDL < HDL². De nombreuses apolipoprotéines

composent les différentes catégories de lipoprotéines et possèdent divers rôles ou fonctions (**Tableau 2**). Ces apolipoprotéines exercent des rôles structuraux comme c'est le cas pour l'ApoB (pour les chylomicrons, les VLDL et les LDL)² ainsi que pour l'ApoA1 et l'ApoA2 (pour les HDL)⁴. Chez l'homme, l'ApoB48 est présente uniquement sur les chylomicrons³ et l'ApoB100 uniquement sur les VLDL, IDL et LDL². Les entérocytes expriment l'enzyme *ApoB mRNA Editing Enzyme Catalytic Subunit 1* (ApoBEC1) qui introduit un codon stop dans le gène de l'ApoB et aboutit à la formation de l'isoforme tronquée de la protéine. Chez l'homme, cette enzyme est absente dans l'hépatocyte. Chez la souris, l'ApoBEC1 est présente dans les hépatocytes, ce qui conduit à la présence d'ApoB48 dans les VLDL murines⁶.

Ces apolipoprotéines ont des rôles fonctionnels. Par exemple, elles agissent comme des ligands de récepteurs. C'est le cas pour l'ApoB100 et l'ApoE qui sont des ligands du récepteur aux LDL (LDLR). Elles agissent comme des inhibiteurs ou des activateurs de certaines enzymes du métabolisme des lipoprotéines. Ainsi, l'ApoC1 et l'ApoC3 sont des inhibiteurs de la lipoprotéine lipase (LPL) alors que ApoC2 et ApoA5 en sont des activateurs. De la même manière, l'ApoA1 et l'ApoC1 sont des activateurs de la *lecithine-cholestérol acyltransferase* (LCAT)¹. D'autre part, certaines apolipoprotéines sont dites échangeables. En effet, l'ApoA1, l'ApoA2, les ApoCs, et l'ApoE possèdent toutes une structure en hélice α amphipathique qui leur permet de se lier aux lipides et ainsi de migrer d'une lipoprotéine à une autre pour moduler le métabolisme de la particule⁷.

Tableau 2: Caractéristiques des apolipoprotéines majeures (tableau adapté de Feingold, 2000¹)

Apolipoprotéine	Source	Localisation	Rôles majeurs
ApoA1	Foie, intestin	Chylomicrons, HDL	Rôle structural Activateur de la LCAT
ApoA2	Foie	Chylomicrons, HDL	Rôle structural
ApoA4	Intestin	Chylomicrons, HDL	Régulation de la taille des chylomicrons
ApoA5	Foie	Chylomicrons, VLDL, HDL	Activateur de la LPL
ApoB48	Intestin	Chylomicrons	Rôle structural
ApoB100	Foie	VLDL, IDL, LDL, Lp(a)	Rôle structural Ligand de LDLR
ApoC1	Foie	Chylomicrons, VLDL, HDL,	Activateur de la LCAT
ApoC2	Foie	Chylomicrons, VLDL, HDL	Co-facteur de la LPL
ApoC3	Foie	Chylomicrons, VLDL, HDL	Inhibiteur de la LPL
ApoE	Foie	Chylomicrons, IDL, HDL	Ligand du LDLR et LRP1
Apo(a)	Foie	Lp(a)	Inhibe l'activation du plasminogène

LRP1 : LDLR related protein 1

2. Métabolisme des lipoprotéines riches en TG

Les TG sont transportés majoritairement dans des particules contenant de l'ApoB et plus précisément, les chylomicrons et les VLDL. Ils permettent d'apporter les TG aux muscles, qui utilisent les acides gras pour produire de l'énergie, et aux tissus adipeux, qui stockent les acides gras pour les rendre disponibles à la production d'énergie en période de jeun¹. Toutefois, bien que le métabolisme des chylomicrons et des VLDL soit très similaire, ces deux types de particules se différencient sur plusieurs points : la source de leurs précurseurs, leur lieu de synthèse et la présence de l'ApoB100 ou de l'ApoB48. En effet, les chylomicrons, qui portent l'ApoB48, sont formés à partir des lipides provenant de l'alimentation et sont donc produits par l'intestin (voie exogène) alors que les VLDL, qui portent l'ApoB100, sont formées à partir des lipides endogènes et sont produits par le foie.

2.1. Synthèse des chylomicrons par l'intestin

Après un repas, les lipides alimentaires sont digérés dans la lumière de l'intestin et sont émulsifiés par les acides biliaires avant d'être absorbés par les entérocytes au niveau du duodénum. Plus précisément, les TG sont hydrolysés soit par la lipase gastrique soit par la lipase pancréatique pour former des diacylglycérols (DAG), des monoacylglycérol (MAG) et des acides gras. Le cholestérol estérifié est hydrolysé par les carboxylestérases pour former du cholestérol libre et des acides gras. Les acides gras produits sont alors captés par les entérocytes soit par diffusion passive soit via une interaction avec les protéines *cluster determinant 36* (CD36) ou *fatty acid transport protein 4* (FATP4). Ils sont ensuite transportés dans l'entérocyte par les *fatty acid-binding protein* (FABPs) puis sont resynthétisés en TG dans le réticulum endoplasmique (RE) grâce à l'action des enzymes *diacylglycerol acyltransferases* (DGATs). D'autre part, l'absorption du cholestérol est assurée par les protéines *Niemann-Pick C1-Like Protein 1* (NPC1L1) et le *scavenger receptor B1* (SR-B1). Il est ensuite estérifié par l'*acyl-CoA : cholesterol acyltransferase* (ACAT) et transporté dans le RE. Une fois re-estérifiés, les lipides sont assemblés en chylomicrons de manière similaire à ce qui est observé pour les VLDL (décrit dans la partie I- 2.2.). Pour différence, la forme tronquée de l'ApoB (ApoB48) est incorporée dans les lipoprotéines au lieu de l'ApoB100. Les chylomicrons acquièrent également l'ApoA4 au cours de leur assemblage (**Figure 2**)³. Les pré-chylomicrons sont ensuite transportés vers l'appareil de Golgi où ils poursuivent leur maturation et acquièrent d'autres apolipoprotéines dont l'ApoA1 avant d'être sécrétés dans la circulation lymphatique³.

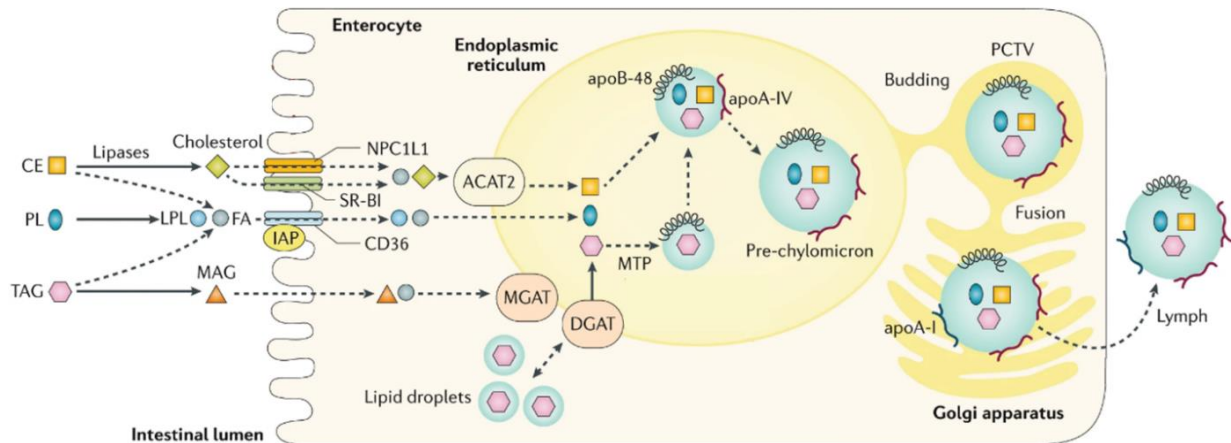


Figure 2 : Synthèse des chylomicrons dans l'entérocyte (schéma adapté de Ko et al., 2020³).

(CE : cholestérol esterifié, PL : phospholipide, TAG : triglycéride, FA : fatty acid, MAG : monoacylglycerol, IAP : intestinal alkaline phosphatase, MGAT : monoacylglycerol:acyltransférase, DGAT : diacylglycerol acyltransférase, PCTV : pre-chylomicron transport vesicle)

2.2. Synthèse des VLDL par le foie

Contrairement aux chylomicrons, les VLDL sont synthétisées par le foie, un des principaux organes impliqués dans le métabolisme des lipoprotéines. Les lipides qui seront incorporés dans ces particules peuvent donc provenir de différentes sources. En condition de jeun, les TG seront principalement synthétisés à partir des acides gras provenant de la lipolyse du tissu adipeux mais pourront également, dans une moindre mesure, provenir de la lipogenèse *de novo* (LDN)⁸. Ils peuvent également provenir de l'hydrolyse des gouttelettes lipidiques stockées dans les hépatocytes⁹ (décrit dans la partie II-2.2.). La synthèse des VLDL débute dans le RE. En effet, le RE est le site de synthèse de l'ApoB100, mais aussi des TG grâce à la présence des enzymes DGATs¹⁰. Lors de la traduction de l'ApoB dans le RE, le peptide ApoB interagit avec la couche de phospholipides du RE pour commencer la formation d'une particule¹¹. En parallèle, l'ApoB interagit avec l'enzyme *microsomal triglyceride transfer protein* (MTTP) qui incorpore des TG, mais aussi des phospholipides et du cholestérol esterifié, dans une moindre mesure, dans la particule naissante¹² (**Figure 2**). Une défaillance dans la traduction de l'ApoB, l'absence de l'enzyme MTTP ou une teneur insuffisante en TG entrainera la dégradation de la lipoprotéine. Pour augmenter la stabilité de la particule, des apolipoprotéines échangeables, tels qu'ApoE, ApoC3 et ApoA4, s'incorporent également à la surface des VLDL. La particule poursuit ensuite sa maturation dans l'appareil de Golgi avant d'être sécrétée dans la circulation sanguine¹¹. Une fois sécrétée dans le sang, les VLDL peuvent acquérir des apolipoprotéines supplémentaires (ApoE, ApoCs) qu'ils échangent avec d'autres lipoprotéines, notamment les HDL².

2.3. Métabolisme intravasculaire des lipoprotéines de basse densité

2.3.1. Conversion des VLDL en IDL : le rôle de la lipoprotéine lipase

Le rôle des VLDL et des chylomicrons est de distribuer des acides gras aux différents tissus périphériques pour leur apporter les substrats énergétiques qui leur sont nécessaires. Afin d'assurer cette fonction, une enzyme, la LPL, joue un rôle essentiel (**Figure 3**). La LPL est une enzyme qui hydrolyse les TG contenus dans les chylomicrons et les VLDL en produisant des acides gras et du glycérol. Elle est produite par différents types cellulaires dont les myocytes, les adipocytes et les macrophages. Au cours de sa maturation dans l'appareil de Golgi, la LPL se lie à des protéoglycanes à héparane (HSPGs) dans des vésicules de sécrétion où elle peut être soit stockée sous forme d'oligomère soit dégradée par les lysosomes. Ainsi, la LPL mature est liée aux HSPGs à la surface de l'endothélium et peut être relâchée dans la circulation sanguine par l'héparine. Pour que la LPL puisse assurer l'hydrolyse intravasculaire des chylomicrons et des VLDL, la protéine *glycosylphosphatidylinositol-anchored HDL-binding protein 1* (GPIHBP1), exprimée à la surface des cellules endothéliales voisines, se lie à la LPL pour la transporter dans la lumière des capillaires. De nombreuses études ont montré que la LPL est catalytiquement active sous forme de dimères bien que des études plus récentes suggèrent que les formes monomériques le sont également. D'autre part, son activité est fortement régulée au niveau post-traductionnel dans le compartiment intravasculaire notamment par plusieurs apolipoprotéines et protéines de la famille des *angiopoietin-like* (ANGPTLs). En effet, l'ApoC2 est un co-facteur indispensable à l'activation de la LPL. L'activité de la LPL peut également être augmentée par sa liaison avec l'ApoA5. A l'inverse, l'ApoC1 et surtout l'ApoC3 inhibent fortement son activité. Les ANGPTL3, 4 et 8 sont également des inhibiteurs de la LPL¹³. Ainsi, en conditions physiologiques, la LPL hydrolyse environ 50% des TG contenus dans les VLDL².

Le tissu adipeux brun joue un rôle particulièrement important dans le métabolisme intravasculaire des lipoprotéines riches en TG. La fonction principale de ce tissu est la thermogénèse qui permet de générer de la chaleur à partir des acides gras. Les acides gras utilisés par les adipocytes brun proviennent majoritairement de l'hydrolyse des TG contenus dans les chylomicrons ou les VLDL par la LPL¹⁴. Chez la souris, ce phénomène est particulièrement important et l'activation du tissu adipeux brun est, par ailleurs, associée à une réduction des concentrations plasmatiques de TG¹⁵.

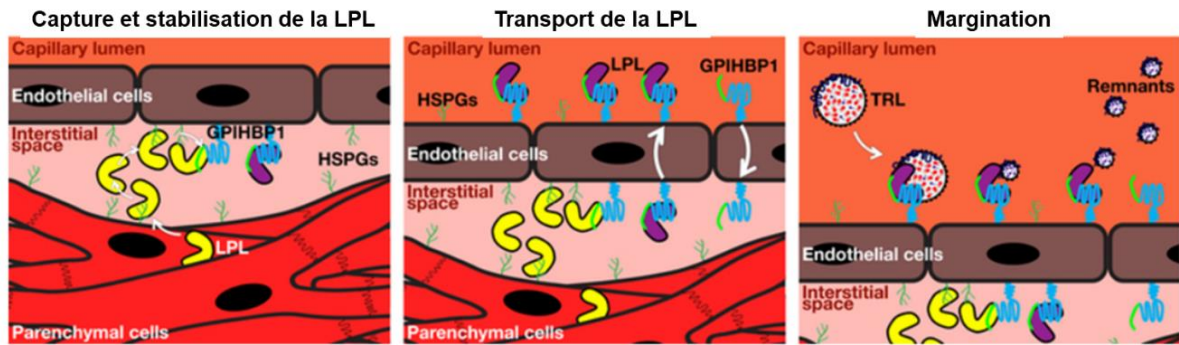


Figure 3 : Mécanisme d'action de la LPL (schéma adapté de Toung et al., 2019¹⁶).
TRL : TG-rich lipoprotein

2.3.2. Conversion des IDL en LDL

Après la dissociation de la LPL des VLDL, ces particules appauvries en TG deviennent alors des *remnants* de VLDL ou IDL. Par la suite, des échanges d'apolipoprotéines se produisent : ApoC3 et ApoC2 sont transférées des VLDL vers les HDL et l'ApoE est transférée des HDL vers les VLDL. Grâce à l'ApoE, ces particules vont pouvoir être reconnues par des récepteurs dans le foie. Toutefois, seulement la moitié des *remnants* de VLDL vont être captés par le foie tandis que le reste de ces particules va subir une seconde hydrolyse de leur TG par la lipase hépatique (HL). Les *remnants* de VLDL restants se concentrent alors en cholestérol, perdent l'ApoE et sont ainsi convertis en LDL (**Figure 4**)².

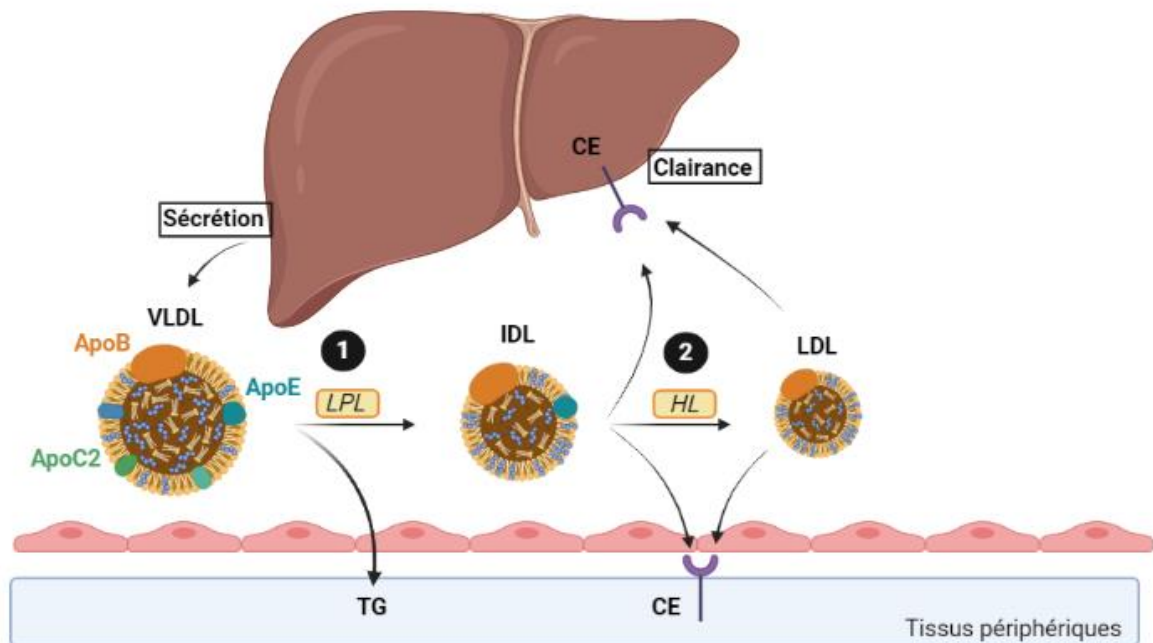


Figure 4 : Schéma simplifié de la cascade VLDL, IDL, LDL.
(1) Conversion des VLDL en IDL, (2) Conversion des IDL en LDL (CE : Cholestérol estérifié).

2.3.3. Remodelage intravasculaire des lipoprotéines par la CETP

La composition lipidique des lipoprotéines peut également être modifiée sous l'action de la *cholesteryl ester transfer protein* (CETP). Cette protéine permet le transfert de cholestérol estérifié des particules riches en cholestérol vers les particules pauvres en cholestérol en échange de TG (**Figure 5**). Plus précisément, la CETP permet le transfert de cholestérol estérifié des HDL vers les VLDL ou les LDL et, en retour, le transfert de TG des VLDL ou des LDL vers les HDL¹⁷. La CETP joue donc un rôle majeur dans le contrôle de la concentration plasmatique de LDL-cholestérol (LDL-C). Toutefois, la CETP n'est pas exprimée chez le rat et la souris ce qui explique la différence de leur profil lipoprotéique favorisant ainsi un important enrichissement en HDL-cholestérol (HDL-C) vis-à-vis de l'Homme¹⁸. En effet, les espèces exprimant la CETP, comme le lapin et le hamster, présente un profil lipoprotéique similaire à l'homme, riche en LDL-C¹⁹.

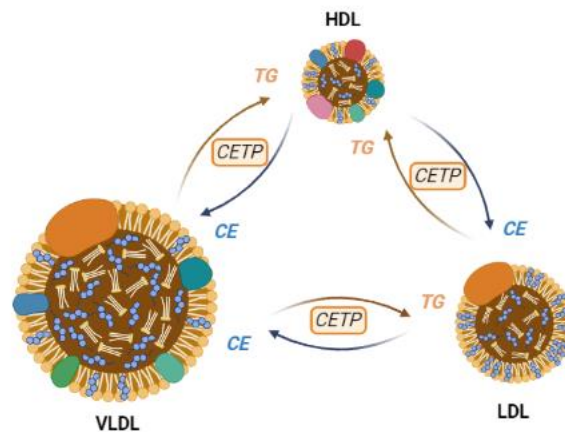


Figure 5 : Mécanisme d'action de la CETP.
(CE : Cholestérol estérifié)

2.4. Les récepteurs des lipoprotéines de basse densité

Les *remnants* de chylomicrons et de VLDL ainsi que les LDL sont captés par le foie et les tissus périphériques par différents récepteurs de la famille du récepteur LDLR qui comprend également les *LDLR related protein* (LRP) et le récepteur aux VLDL (VLDLR) mais aussi grâce à l'action des HSPG. Cependant, ces récepteurs ne sont pas exprimés dans tous les tissus et n'ont pas la même importance dans la capture des lipoprotéines²⁰. En effet, l'invalidation génique simultanée de LDLR, LRP1 et des HSPGs a montré que ces récepteurs sont en majorité responsables de la capture des lipoprotéines et que les autres récepteurs ne sont pas capables de compenser leur absence pour assurer une clairance correcte de ces particules²¹. De plus, selon cette même étude, ces différents récepteurs n'assurent pas la clairance du même type de particules : LDLR serait plutôt impliqué dans la clairance des particules de grandes tailles enrichies en ApoE alors que les HSPG

assureraient plutôt la captation des particules de petites tailles enrichies en ApoE et ApoA5²¹.

2.4.1. LDLR

LDLR est le récepteur qui assure la majorité de la capture des lipoprotéines de basse densité. Il permet la capture des *remnants* de chylomicrons et de VLDL mais aussi des LDL. Il est fortement exprimé dans le foie mais aussi dans de nombreux tissus périphériques notamment le tissu adipeux et le muscle²⁰. LDLR capte les lipoprotéines en se liant à l'ApoE (pour les chylomicrons et les VLDL) ou à l'ApoB100 (pour les LDL) présentes à leurs surfaces. Les protéines adaptatrices *LDLR adaptator protein 1* (LDLRAP1) et *disabled-2* (DAB2) permettent ensuite l'endocytose des particules dans des vésicules de clathrine²². Le récepteur se sépare de la lipoprotéine avec l'acidification de l'endosome. Il sera ensuite recyclé à la membrane tandis que la particule sera dégradée par les lysosomes, libérant ainsi les lipides dans la cellule²³.

Les régulateurs transcriptionnels et post-traductionnels du récepteur LDLR jouent un rôle tout aussi important dans le contrôle de la capture des lipoprotéines (**Figure 6**). Tout d'abord, l'expression du LDLR est finement régulée par la concentration intracellulaire de cholestérol. En effet, LDLR est un gène cible du facteur de transcription *sterol regulatory element-binding protein 2* (SREBP2)²⁴. Lorsque les concentrations intracellulaires de cholestérol sont faibles, SREBP2 est clivé, sa partie N-terminale est transloquée vers le noyau pour induire l'expression des gènes de la biosynthèse du cholestérol mais aussi du gène LDLR pour favoriser la capture du cholestérol contenu dans les LDL. L'augmentation des concentrations intracellulaires de cholestérol consécutive à la capture de particules riche en cholestérol entraîne une diminution du clivage de SREBP2 et donc une diminution de la traduction du LDLR. Toutefois, une étude suggère que la capture des LDL par le foie n'est pas à l'origine d'une inhibition de l'activité de SREBP2 au contraire des *remnants* de chylomicrons et de VLDL²⁵.

D'autres part, l'activation de SREBP2 régule l'expression de la *proprotein convertase subtilisin kexin type 9* (PCSK9)²⁶. Depuis plusieurs années, de nombreuses études génétiques ont montré que des mutations dans le gène de *PCSK9* associées à un gain ou une perte de fonction sont respectivement responsables du développement d'une hypercholestérolémie²⁷ ou hypocholestérolémie²⁸ démontrant son importance dans la régulation du métabolisme du cholestérol. PCSK9 est une protéine majoritairement produite par le foie et sécrétée dans le sang où elle se lie au LDLR et empêche ainsi son recyclage à la membrane en induisant sa dégradation par les lysosomes²⁹. De ce fait, l'activation

simultanée de la transcription de LDLR et PCSK9 par SREBP2 est un mécanisme permettant de protéger le foie d'une accumulation toxique de cholestérol.

En parallèle, les métabolites du cholestérol générés lors de l'augmentation du cholestérol dans la cellule vont permettre l'activation du récepteur nucléaire *liver X receptor* (LXR) dont le gène cible *inducible degrader of the LDLR* (IDOL), est un régulateur du LDLR. L'activation de IDOL, une ubiquitine ligase de type E3, conduit à l'ubiquitinylation du LDLR sur son domaine cytoplasmique favorisant ainsi sa dégradation par le protéasome³⁰.

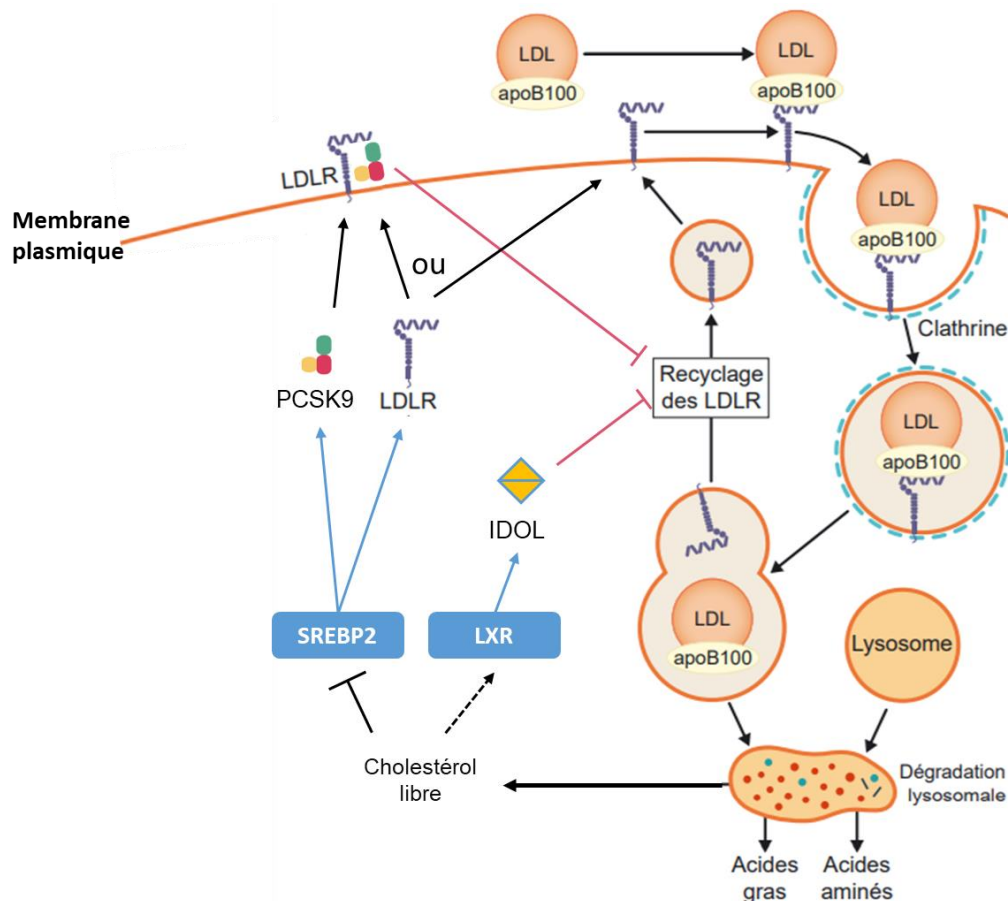


Figure 6 : Mécanisme d'endocytose et régulation du LDLR (schéma adapté de Gautier et al., 2010³¹).

2.4.2. LRP1

LRP1 est un autre récepteur des lipoprotéines de basse densité appartenant également à la famille de récepteur LDLR. Il assure une partie de la clairance des *remnants* de chylomicrons et de VLDL et agit de façon complémentaire au LDLR en interagissant avec l'ApoE pour internaliser les lipoprotéines qui seront dégradées par les lysosomes²³. Toutefois, LRP1 ne joue pas un rôle majeur dans la clairance quand LDLR est présent²¹.

2.4.3. Les HSPGs

Enfin, les HSPG sont également des acteurs importants de la clairance des lipoprotéines (**Figure 7**). Les HSPGs sont des glycoprotéines composées d'une ou plusieurs chaînes d'héparanes sulfates, des polysaccharides linéaires, attachées de manière covalente à des protéines centrales. Ces structures, présentes généralement à la surface des cellules, sont capables d'interagir avec un grand nombre de ligands mais aussi d'agir comme des récepteurs pour permettre l'endocytose³². Plusieurs études montrent que les HSPGs sont capables d'assurer la capture des lipoprotéines riches en TG par une voie indépendante des récepteurs LDLR et LRP notamment en se liant à certaines apolipoprotéines comme ApoE et ApoA5³³⁻³⁵. Plus précisément, syndecan-1 semble être le HSPG le plus impliqué dans la capture des lipoprotéines³⁶. Les HSPG, et notamment syndecan-1, peuvent également agir en coopération avec LDLR et LRP1 en piégeant les lipoprotéines pour les présenter à ces récepteurs³⁷. Les HSPG régulent également la dégradation du LDLR. En effet, il est montré que les HSPG permettent de piéger PCSK9 pour le présenter au LDLR facilitant ainsi la liaison entre PCSK9 et LDLR conditionnant la dégradation du récepteur³⁸.

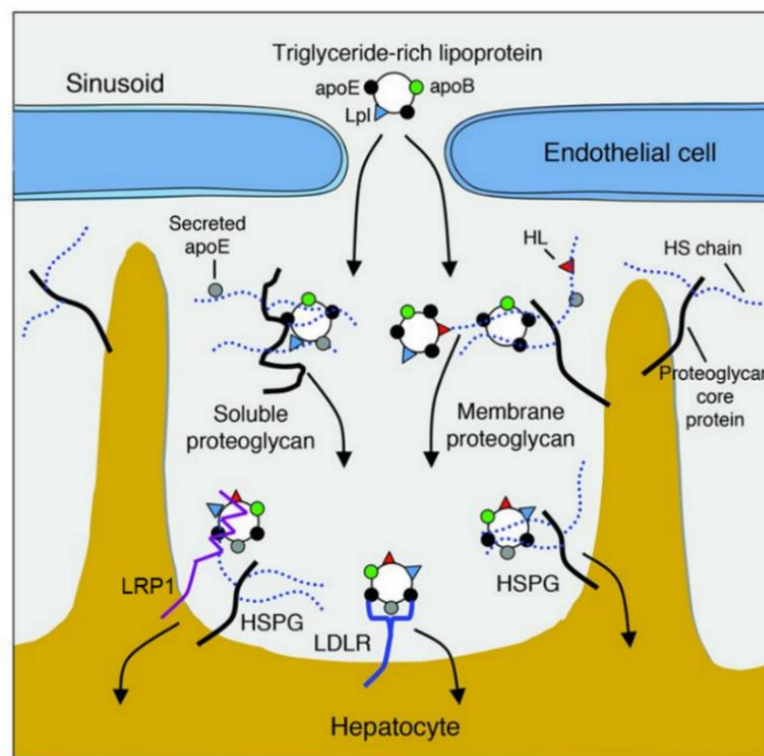


Figure 7 : Mécanisme de capture des lipoprotéines par les HSPGs (schéma adapté de MacArthur et al., 2007³⁴)
(HS : Héparane sulfate)

2.5. La lipoprotéine (a)

La Lp(a) représente la dernière catégorie de particules liées à l'ApoB. Cette catégorie de lipoprotéine n'est pas présente chez la souris qui n'exprime pas l'Apo(a). Sa composition est très proche de celle des LDL : elle contient une protéine ApoB100 à laquelle se lie de façon covalente la glycoprotéine apo(a) dans le foie. Le mécanisme de clairance de la Lp(a) est lui aussi peu connu. La Lp(a) est capable de se lier à certains membres de la famille des récepteurs LDLR. Bien qu'elle ait été décrite pour la première fois en 1963, son rôle physiologique dans le métabolisme des lipoprotéines n'a toujours pas été clairement établi⁵. Toutefois, diverses études montrent qu'une concentration plasmatique élevée de Lp(a) est associée à une augmentation du risque cardiovasculaire³⁹. Néanmoins, les concentrations plasmatiques de Lp(a) chez l'homme sont strictement régulées au niveau génétique. A l'exception des inhibiteurs de PCSK9⁴⁰, la plupart des traitements hypolipémiants sont sans effets sur les concentrations de Lp(a)⁴¹. La Lp(a) est un transporteur préférentiel pour les phospholipides oxydés⁵, décrit pour stimuler la réponse inflammatoire et l'agrégation plaquettaire favorisant ainsi son athérogénicité⁴².

3. Métabolisme des HDL

Comme décrit précédemment, les LDL permettent de distribuer le cholestérol aux différents tissus périphériques. Au contraire, bien qu'ils transportent majoritairement du cholestérol, le rôle des HDL n'est pas de le délivrer aux différents tissus périphériques mais de récupérer le cholestérol en excès dans ces tissus et de le transporter jusqu'au foie. En effet, le foie est le seul organe capable de métaboliser le cholestérol pour qu'il soit en partie éliminé grâce à la bile. Ce processus est le transport inverse du cholestérol.

3.1. Synthèse des HDL

Les HDL sont produites majoritairement par le foie⁴ mais aussi par l'intestin³. Leurs synthèses débutent par la production de leur protéine structurale, l'ApoA1, qui est sécrétée dans le plasma sous la forme d'une particule discoïdale dépourvue ou pauvre en lipides que l'on appelle un pré β -HDL. Le transporteur *ATP-binding cassette (ABC) A1*, situé sur les hépatocytes et les entérocytes, joue un rôle essentiel dans la formation de ces particules. En effet, l'interaction des pré β -HDL avec ABCA1 va permettre l'incorporation de cholestérol libre et de phospholipides à la surface des particules⁴³. Les pré β -HDL peuvent également acquérir le cholestérol libre et les phospholipides qui se dissocient des lipoprotéines riches en TG pendant leur lipolyse⁴⁴. Ce cholestérol libre est ensuite estérifié par l'enzyme LCAT, activé par l'ApoA1, qui permet le transfert d'un acide gras des phospholipides vers le

cholestérol libre. Le cholestérol estérifié ainsi formé migre vers le cœur de la particule et donne alors une forme sphérique aux HDLs qui deviennent matures⁴⁵. Des échanges d'apolipoprotéines interviennent ensuite entre les HDL matures et les autres lipoprotéines comme l'ApoA4 et l'ApoE qui sont transférées respectivement des *remnants* de chylomicrons et de VLDL vers les HDL (**Figure 8**)⁴.

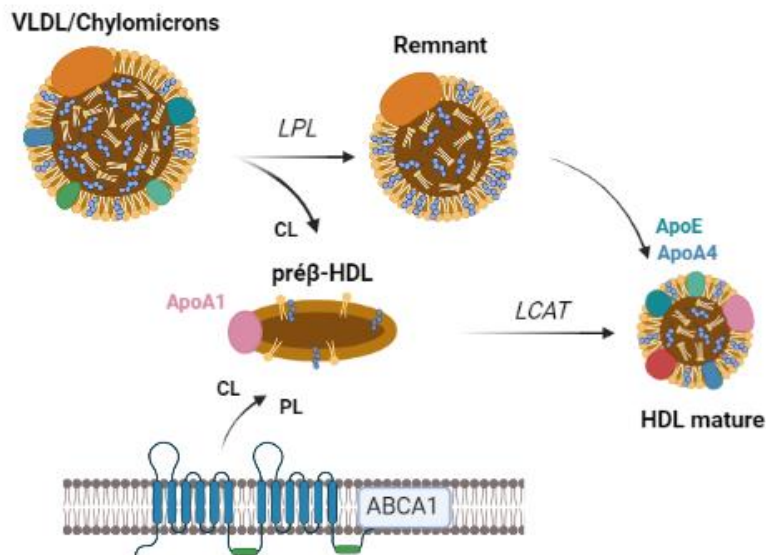


Figure 8 : Synthèse des HDL.
(CL : cholestérol libre, PL : phospholipide).

3.2. Modification intravasculaire des HDL

La composition et la taille des HDL évoluent également au cours du temps et plusieurs protéines sont responsables de ce remodelage. Au cours de la lipolyse des lipoprotéines riches en TG par la LPL, des lipides de la surface de ces particules, plus précisément des phospholipides et du cholestérol libre, sont transférés aux HDL pour adapter la taille des *remnants* de chylomicrons et de VLDL à leur contenu lipidique⁴⁶. Comme discuté précédemment (voir I – 2.3.3), la CETP facilite le transfert du cholestérol des HDL vers les VLDL et les LDL et favorise ainsi la diminution de la concentration plasmatique d'HDL-C¹⁷. En contrepartie, elle favorise l'enrichissement des HDL en TG. Ces HDL deviennent alors des substrats pour la HL qui hydrolyse les TG et, dans une moindre mesure, les phospholipides, réduisant ainsi la taille de celles-ci⁴⁷. La lipase endothéliale est une autre enzyme qui permet le remodelage des HDL. Toutefois, contrairement à la HL, la lipase endothéliale hydrolyse préférentiellement les phospholipides⁴⁸. Enfin, la *phospholipid transfer protein* (PLTP) est une protéine qui permet le transfert de phospholipides entre les lipoprotéines riches en TG et les HDL. Il est également montré que la PLTP est responsable du remodelage des HDL en provoquant la fusion de HDLs qui aboutit soit à la formation de petites HDL soit à la dissociation de l'ApoA1 et à la formation d'HDL plus larges⁴⁹.

3.3. Le transport inverse du cholestérol

Les HDL sont des acteurs majeurs du transport inverse du cholestérol. Ce processus regroupe différentes étapes débutant par la captation du cholestérol contenu dans les tissus périphériques par les HDL (efflux de cholestérol), les échanges de lipides entre les lipoprotéines dans le contenu intravasculaire par la CETP, la captation de ces particules par le foie et le transfert du cholestérol dans la bile. Plus récemment, il a également été montré que l'intestin joue un rôle important dans l'élimination du cholestérol plasmatique via le mécanisme d'excrétion trans-intestinale du cholestérol (TICE).

3.3.1. Mécanismes d'efflux de cholestérol par les HDL

Plusieurs mécanismes sont responsables de l'efflux de cholestérol par les HDL. Parmi eux, on retrouve des mécanismes simples comme celui de la diffusion aqueuse et ceux nécessitant l'intervention d'un transporteur : les membres de la famille des transporteurs ABC, et plus précisément ABCA1 et ABCG1, et le récepteur SR-B1 (**Figure 9**). Toutefois, la contribution relative de ces transporteurs est différente entre l'homme et la souris. En effet, chez la souris, l'efflux de cholestérol des macrophages est majoritairement assuré par la diffusion aqueuse, ABCA1 et ABCG1 et très peu par SR-B1⁵⁰. Chez l'homme, ABCA1 mais aussi SR-B1 jouent un rôle important alors qu'ABCG1 semble minoritaire⁵¹.

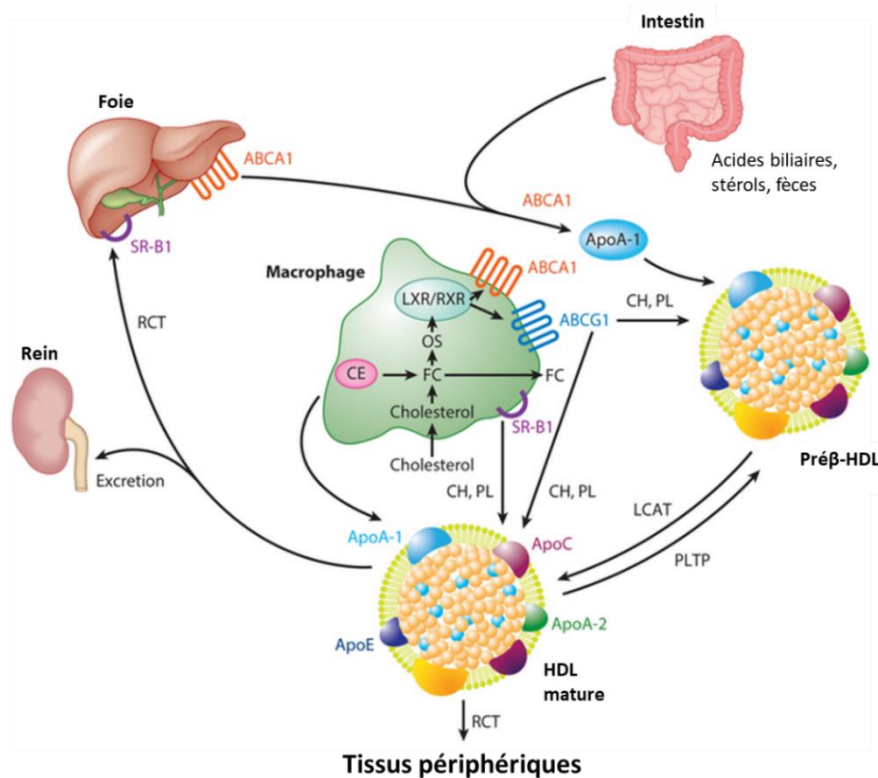


Figure 9 : Mécanismes d'efflux de cholestérol par les HDL (schéma adapté de Shen et al., 2018⁵²).
(CH : cholestérol, FC : free cholesterol, OS : oxystérol, PL : phospholipides, RCT : transport inverse du cholestérol)

3.3.1.1. Diffusion aqueuse

Le mécanisme de diffusion aqueuse est un processus de diffusion simple et implique un transfert passif bidirectionnel du cholestérol libre entre la membrane plasmique de la cellule et les particules HDL. Plus précisément, le cholestérol libre contenu dans la membrane plasmique peut se détacher et se retrouver dans la phase aqueuse puis interagir avec la couche de phospholipides des HDL. Le taux de transfert de cholestérol entre les cellules et les HDL est influencé par le ratio cholestérol libre/phospholipides. Toutefois, il n'est pas clair si ce mode d'efflux de cholestérol joue un rôle physiologique important chez l'homme⁵³.

3.3.1.2. Les transporteurs de famille ABC

ABCA1 et ABCG1 sont deux protéines appartenant à la famille des transporteurs ABC décrites comme permettant l'efflux de cholestérol vers les HDL^{43,54}. Lorsque le taux intracellulaire de cholestérol augmente, permettant la formation d'oxysterols, LXR est activé, induit l'expression d'ABCA1 et ABCG1⁵⁵ et favorise la conversion du cholestérol en acides biliaires dans le foie. Contrairement au processus de diffusion aqueuse et celui facilité par SR-B1, le transfert de lipides vers les HDL est unidirectionnel. De plus, ces deux transporteurs semblent jouer des rôles complémentaires dans l'efflux de cholestérol puisqu'ils interagissent préférentiellement avec des accepteurs différents. Comme décrit précédemment, le transporteur ABCA1 est un acteur majeur de la biosynthèse des HDL et interagit avec les préβ-HDL pour les remplir de cholestérol et de phospholipides. Au contraire, le transporteur ABCG1 semble plutôt interagir avec les HDL matures⁵⁶. ABCA1 et ABCG1 jouent un rôle particulièrement important dans l'efflux de cholestérol des macrophages⁵⁷. L'accumulation de cholestérol dans les macrophages conduit à la formation de cellules spumeuses dites « *foam cells* », une étape clé du développement de l'athérosclérose⁵⁸. Dans ce contexte, l'activation des transporteurs ABCA1 et ABCG1 est bénéfique puisqu'elle permet de réduire cette accumulation.

3.3.1.3. Le récepteur SR-B1

Le récepteur SR-B1 est un acteur majeur du transport inverse du cholestérol. Il est exprimé dans de nombreux tissus et cellules comme le foie mais aussi l'intestin, les macrophages, les cellules musculaires et adipeuses⁵². Contrairement au récepteur des LDL, le transfert de lipides par SR-B1 fait intervenir un phénomène de diffusion passif bidirectionnel qui ne nécessite pas l'internalisation de la particule. Lorsque le HDL se fixe à SR-B1, le cholestérol libre ou estérifié et les TG sont transférés entre la cellule et le HDL selon un gradient de concentration⁵⁹. SR-B1 joue un rôle majeur dans la phase terminale du transport inverse du cholestérol en favorisant le retour des particules HDL au foie et l'élimination du cholestérol⁵².

Les particules HDL appauvries en cholestérol retournent dans la circulation et se remplissent à nouveau de cholestérol.

3.3.1.4. La voie P2Y₁₃– F₀F₁ ATPase

Plus récemment, un récepteur permettant l'endocytose des HDL a été mis en évidence. La chaîne β du complexe F₀F₁ ATPase, initialement décrit comme responsable de la synthèse d'ATP dans la mitochondrie, a été identifié comme un récepteur hépatique de l'ApoA1⁶⁰. Il a été montré que la fixation de l'ApoA1 sur la chaîne β du complexe F₀F₁ ATPase entraîne l'hydrolyse de l'ATP en ADP qui stimule la capture du HDL par les hépatocytes via l'activation du récepteur P2Y₁₃⁶¹.

3.3.2. Elimination hépatobiliaire du cholestérol

Dans le foie, le cholestérol peut être éliminé en étant converti en acide biliaires. Les acides biliaires sont des molécules amphiphiles permettant l'émulsification des lipides et sont déversés dans l'intestin après un repas pour favoriser l'absorption intestinale des lipides alimentaires.

Les acides biliaires sont synthétisés, dans le foie, à partir du cholestérol soit par la voie classique utilisant l'enzyme *cytochrome P450 family 7 subfamily A member 1* (CYP7A1), soit par la voie alternative initiée par l'enzyme CYP27A1 et sont conjugués avec la glycine (chez l'homme) ou la taurine (chez la souris). Ils sont ensuite transportés dans la vésicule biliaire majoritairement par BSEP, mais aussi par plusieurs membres de famille des transporteurs ABC, pour y être stockés. Les phospholipides et le cholestérol peuvent également être directement transportés dans la vésicule biliaire grâce aux transporteurs ABCB4, ABCB1 et ABCG5/ABCG8. Après un repas, la bile est déversée dans le duodénum pour permettre l'émulsification des lipides alimentaires. Il existe, par ailleurs, une circulation entéro-hépatique des acides biliaires puisque la majorité des acides biliaires sécrétés dans l'intestin sont réabsorbés dans la partie terminale de l'iléon et remis en circulation vers le foie. A chaque cycle, environ 5% des acides biliaires sont éliminés dans les fèces et contribuent ainsi à l'élimination du cholestérol de l'organisme⁶².

3.3.3. L'excrétion trans-intestinale du cholestérol

L'excrétion hépatobiliaire n'est pas le seul mode d'élimination du cholestérol dans l'organisme. Récemment, de nombreuses études montrent que l'intestin joue un rôle clé dans l'élimination du cholestérol par la voie du TICE. Cette voie permet la capture des particules riches en cholestérol présente dans la circulation sanguine par l'intestin. Toutefois, le rôle des HDL dans le TICE est controversé et les données actuelles suggèrent que les substrats majoritaires de cette voie sont les lipoprotéines à ApoB (VLDL et LDL). En ce sens,

plusieurs études ont montré que le récepteur SR-B1 n'influence pas la capture du cholestérol par les entérocytes au contraire du récepteur LDLR. Une fois capté par les entérocytes, le cholestérol est alors excrété dans la lumière intestinale notamment grâce aux transporteurs ABCG5/ABCG8⁶³.

4. Dérégulation du métabolisme des lipoprotéines : la dyslipidémie

Une dyslipidémie se définit par une dérégulation des concentrations plasmatiques de lipides dans le sang. Elle peut être d'origine génétique comme c'est le cas pour l'hypercholestérolémie familiale. Cette pathologie est causée majoritairement par des variants pathogènes des gènes codant pour LDLR, APOB ou PCSK9 qui conduisent à une perturbation de la sécrétion ou de la clairance des lipoprotéines⁶⁴. Les dyslipidémies peuvent également survenir lors d'un traitement pharmacologique ou consécutivement à une autre maladie. Parmi ces maladies, on retrouve notamment le diabète de type 2 (DT2) et l'obésité⁶⁵. Chez ces patients, on observe une augmentation de la production et de la sécrétion de VLDL par le foie qui favorise alors une hypertriglycéridémie, l'apparition de LDL petits et denses (*small dense LDL*, sdLDL)^{66,67} et s'accompagne d'une faible concentration de particules HDL^{68,69}. Ces perturbations augmentent alors considérablement le risque cardiovasculaire.

Le foie joue un rôle central dans le métabolisme des lipoprotéines puisqu'il participe à la production et/ou à la clairance de toutes les classes de lipoprotéines. En plus de son rôle dans le métabolisme des lipoprotéines, le foie est également un site majeur du métabolisme de leurs composants, les TG et le cholestérol. Une dérégulation du métabolisme glucido-lipidique dans le foie conduit au développement de la stéatose hépatique non alcoolique (*non alcoholic fatty liver disease*, NAFLD) ou stéatose hépatique métabolique (*metabolic-associated fatty liver disease*, MAFLD). Plusieurs études ont montré que les patients atteints de NAFLD présentent souvent une dyslipidémie athérogène⁷⁰⁻⁷³. Il semble donc exister un lien complexe entre la NAFLD et l'altération du métabolisme des lipoprotéines.

Partie 2 : Métabolisme hépatique et NAFLD

1. Anatomie générale du foie

1.1. Macroscopique

Chez l'homme, le foie est composé de 4 lobes : les lobes droit et gauche, qui représentent les lobes principaux, et les lobes carré et caudé. Le foie est fortement associé au tractus gastro-intestinal auquel il est relié par divers ligaments⁷⁴. De part sa proximité anatomique, le foie reçoit les substances absorbées par l'intestin et destinées à être métabolisées via la veine porte. De plus, le foie est le site de synthèse des acides biliaires qui aident à l'absorption des lipides alimentaires. En effet, la bile est transportée du foie vers la vésicule biliaire dans le canal hépatique via le canal cystique pour y être stockée et concentrée puis sécrétée dans le duodénum après un repas via le canal cholédoque (**Figure 10**)⁷⁵.

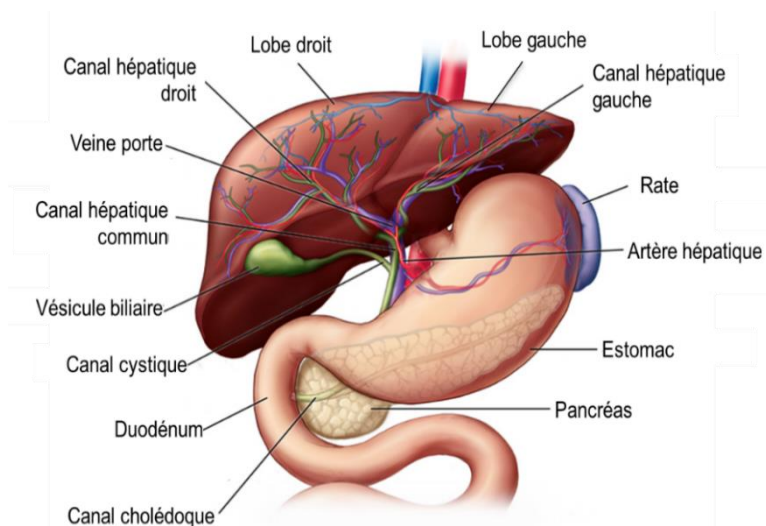


Figure 10 : Anatomie du foie et lien avec le tractus gastro-intestinal

(schéma adapté de <https://www.hopkinsmedicine.org/health/conditions-and-diseases/liver-anatomy-and-functions>)

1.2. Microscopique

Le foie est composé de différents types cellulaires. Les hépatocytes, qui représentent environ 80% de la masse du foie, se regroupent sous la forme de structures hexagonales que l'on appelle des lobules. Au centre de chaque lobule, on retrouve une veine centrale de laquelle s'étendent des travées d'hépatocytes ainsi que des vaisseaux sanguins (sinusoïdes). A chaque coin du lobule, on retrouve une triade portale composée d'une branche d'un canal biliaire, d'une veine porte, et d'une artère hépatique (**Figure 11A**)⁷⁵.

D'autres types cellulaires sont également présents dans le foie. Tout d'abord, le foie comporte des cholangiocytes qui permettent le transport de la bile au sein du lobule jusqu'au

canal biliaire. On y retrouve également les cellules endothéliales composant les vaisseaux sanguins entourant les hépatocytes. D'autres part, ces sinusoides contiennent les cellules de K upffer (les macrophages résidents du foie) qui sont des cellules phagocytaires et sécrétrices de cytokines aux propriétés anti-inflammatoires. Entre ces cellules endothéliales et les hépatocytes se trouve l'espace de Disse. Ce compartiment contient les cellules stellaires. Ces cellules sont capables de stocker la vitamine A et de sécréter des composants de la matrice extracellulaire. Elles jouent un rôle particulièrement important en cas de lésion hépatique en stimulant la production de collagène lorsqu'elles sont activées déclenchant ainsi le mécanisme de fibrose (**Figure 11B**)⁷⁵.

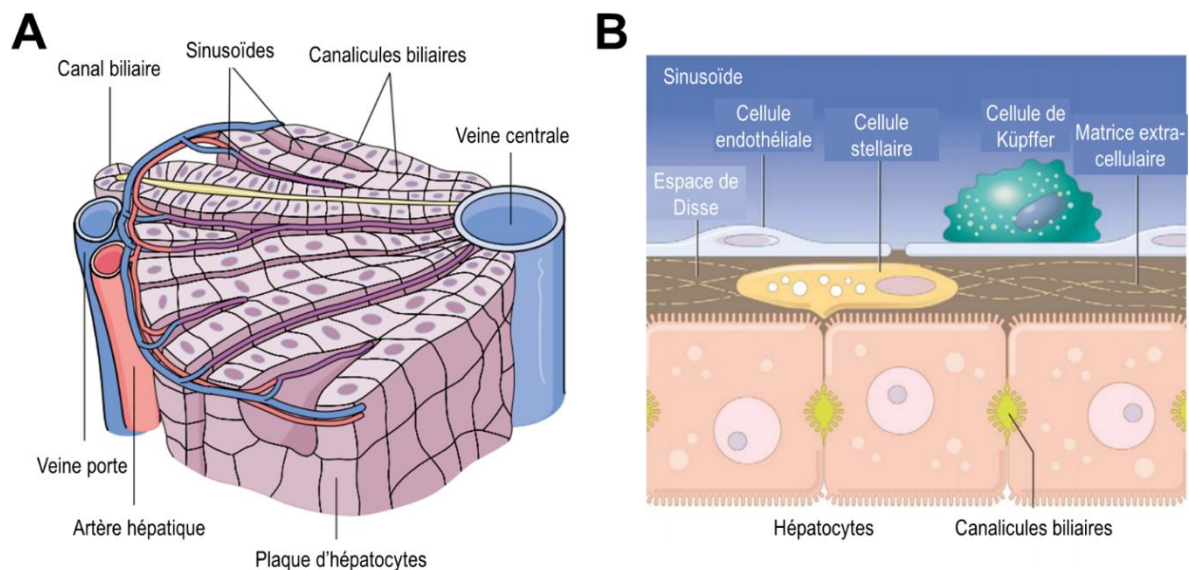


Figure 11 : Les différents types cellulaires du foie (adapté de Haschek et al., 2010⁷⁵).
 (A) Schéma d'un lobule hépatique. (B) Schéma de l'espace de Disse.

2. Les différentes fonctions métaboliques du foie

Le foie est un organe métabolique régulant diverses fonctions essentielles à l'organisme. Parmi ces principales fonctions, on retrouve la dégradation des substances toxiques, la synthèse des protéines, la production de la bile et la régulation de l'homéostasie énergétique dans l'organisme. C'est ce dernier rôle qui va nous intéresser ici.

2.1. Le métabolisme glucidique

Après un repas, le glucose sanguin entre dans le foie grâce au transporteur de glucose de type 2 (GLUT2). Une fois dans la cellule, le glucose peut alors être métabolisé selon deux voies différentes. Le glucose peut être utilisé pour apporter de l'énergie à la cellule et subir dans ce cas la glycolyse. Ce processus aboutit à la formation de pyruvate (ou de lactate) puis d'acetyl-coA qui est un précurseur à la formation d'ATP par le cycle de Krebs. Le glucose peut également être stocké dans le foie sous la forme de glycogène grâce au

phénomène de glycogénogénèse. La sécrétion d'insuline par les cellules β pancréatiques en réponse à l'augmentation de la glycémie va permettre la stimulation de l'enzyme *glycogen synthase*, responsable de la conversion du glucose en glycogène⁷⁶.

Après un jeun court, le foie est capable d'apporter du glucose aux tissus périphériques nécessitant un apport énergétique grâce à la glycogénolyse. Le glycogène est alors hydrolysé sous l'action de l'enzyme *glycogen phosphorylase* pour produire du glucose. Cette enzyme est inhibée en condition post-prandiale par l'insuline mais activée en période de jeun par le glucagon sécrété par les cellules α pancréatiques. Toutefois, si les stocks de glycogènes sont insuffisants, comme c'est le cas lors d'un jeun prolongé, le glucose peut être formé via le processus de néoglucogénèse dans le foie, mais aussi dans les reins et l'intestin, notamment grâce à l'action de la *phosphoenolpyruvate carboxylase* (PEPCK). Cette voie synthétise du glucose à partir du pyruvate, du glycérol, du lactate ou des acides aminés. Ces différents substrats peuvent être déjà présent dans l'hépatocyte mais peuvent aussi provenir du muscle squelettique en conditions de jeun ou d'exercice (**Figure 12**)⁷⁶.

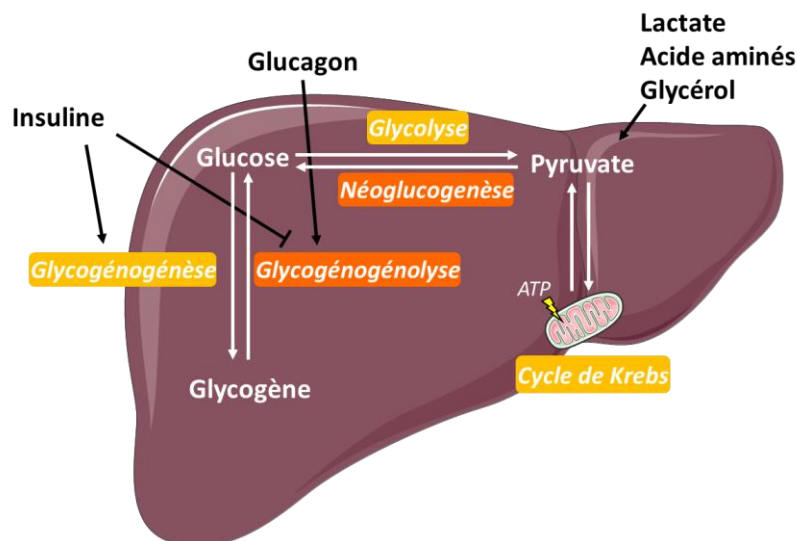


Figure 12 : Métabolisme du glucose dans le foie.

2.2. Le métabolisme lipidique

Le foie est un organe clé du métabolisme des lipides. Il est capable de synthétiser des TG et du cholestérol qui pourront soit être stockés sous la forme de gouttelettes lipidiques soit sécrétés dans les particules VLDL pour apporter des substrats lipidiques aux tissus périphériques. Les acides gras produits par l'hépatocytes pourront également être incorporés aux phospholipides qui sont des composants essentiels de la membrane plasmique mais aussi des VLDL. La source principale d'acides gras dans le foie est le tissu adipeux. En condition de jeun ou d'exercice, suite à la lipolyse du tissu adipeux, des acides gras et du

glycérol libre sont sécrétés dans la circulation et sont captés par le foie grâce à différents récepteurs (FATP1, CD36). L'oxydation de ces acides gras permet d'apporter de l'énergie aux hépatocytes. Toutefois, le foie est également capable d'acquérir des acides gras via la capture des lipoprotéines (comme décrit dans la partie II-2.), par la LDN ou par l'hydrolyse des gouttelettes lipidiques (**Figure 13**).

2.2.1. Formation des gouttelettes lipidiques

Les gouttelettes lipidiques sont des structures simples formées par une membrane de phospholipides dérivées du RE dont le cœur est composé principalement de TG et de cholestérol estérifié. Leur formation débute dans le RE avec la synthèse des TG sous l'action des enzymes DGAT et la formation de cholestérol estérifié grâce aux enzymes ACAT. L'accumulation de lipides dans la lumière du RE entraîne un élargissement de la bicouche de phospholipides qui finit par se séparer du RE pour former la gouttelette lipidique⁷⁷. L'hydrolyse de ces gouttelettes dans le cytoplasme repose sur l'activité de nombreuses enzymes comme l'*adipose triglyceride lipase*, l'*hormone-sensitive lipase*, la *monoacylglycerol lipase*, la *lysosomal acid lipase* et la *patatin like phospholipase domain containing 3* (PNPLA3). Il existe également des enzymes capables d'hydrolyser les gouttelettes lipidiques dans le RE comme les enzymes de la famille des carboxylesterases, la *arylacetamide deacetylase* et la HL⁷⁸. D'autre part, des processus d'autophagie (lipophagie) sont capables d'hydrolyser ces gouttelettes⁷⁷.

2.2.2. La lipogenèse de novo

Lorsque les concentrations intracellulaires de glucose dans l'hépatocyte sont trop élevées, une partie du glucose va être convertie en acides gras grâce à la LDN. En effet, par le biais de la glycolyse et du cycle de Krebs, l'augmentation de glucose dans la cellule aboutit à la formation de citrate converti ensuite en acetyl-coA dans le cytoplasme, un précurseur pour la formation des acides gras. L'acetyl-coA subit alors plusieurs transformations notamment par le biais des enzymes clés *acetyl-coA carboxylase* (ACC) et *fatty acid synthase* (FAS) pour produire des acides gras⁷⁶. Plusieurs facteurs de transcription régulent les gènes de la lipogenèse notamment *carbohydrate response element-binding protein* (ChREBP) qui est activé par le glucose et SREBP1c qui est directement activé par LXR et indirectement par l'insuline^{76,79}.

2.2.3. La β -oxydation

La β -oxydation se met en place principalement en condition de jeun pour apporter de l'énergie à l'hépatocyte mais aussi aux tissus périphériques par la production de corps

cétoniques (β -hydroxybutyrate et acétoacétate). Dans l'hépatocyte, la plupart des acides gras sont oxydés dans la mitochondrie où ils sont transportés grâce à l'enzyme *carnitine palmitoyltransférase 1* (CPT1), l'enzyme limitante de la β -oxydation. Les acides gras à très longues chaînes ($>C22$) sont quant à eux oxydés dans les peroxysomes. Lorsque les capacités d'oxydation du cycle de Krebs sont saturées, l'excès d'acetyl-coA est converti en corps cétoniques. L'acetyl-coA produit est alors métabolisé par l'enzyme *3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA* (HMG-CoA) *synthase 2* dans la mitochondrie au lieu d'entrer dans le cycle de Krebs pour aboutir à la formation d'acétoacétate. La production de β -hydroxybutyrate dépend du ratio $NAD^+/NADH$ qui, quand il est élevé, favorise la conversion de l'acétoacétate en β -hydroxybutyrate. Le *peroxisome proliferator activated receptor* (PPAR) α , dont l'expression est augmentée au cours du jeun, est le régulateur majoritaire de la β -oxydation⁷⁶.

2.2.4. La synthèse du cholestérol

Bien que toutes les cellules soient capables de synthétiser du cholestérol, le foie est responsable d'environ 50% de la synthèse totale. Lorsque les concentrations intracellulaires de cholestérol diminuent, le facteur de transcription SREBP2 est clivé et sa partie N-terminale est transloquée dans le noyau où il active la transcription des gènes impliqués dans la synthèse du cholestérol dont l'enzyme HMG-CoA réductase est l'enzyme limitante. Le cholestérol a la capacité d'inhiber sa propre synthèse puisque son augmentation dans la cellule va entraîner une diminution du clivage de SREBP2 et diminuer la synthèse de cholestérol⁸⁰.

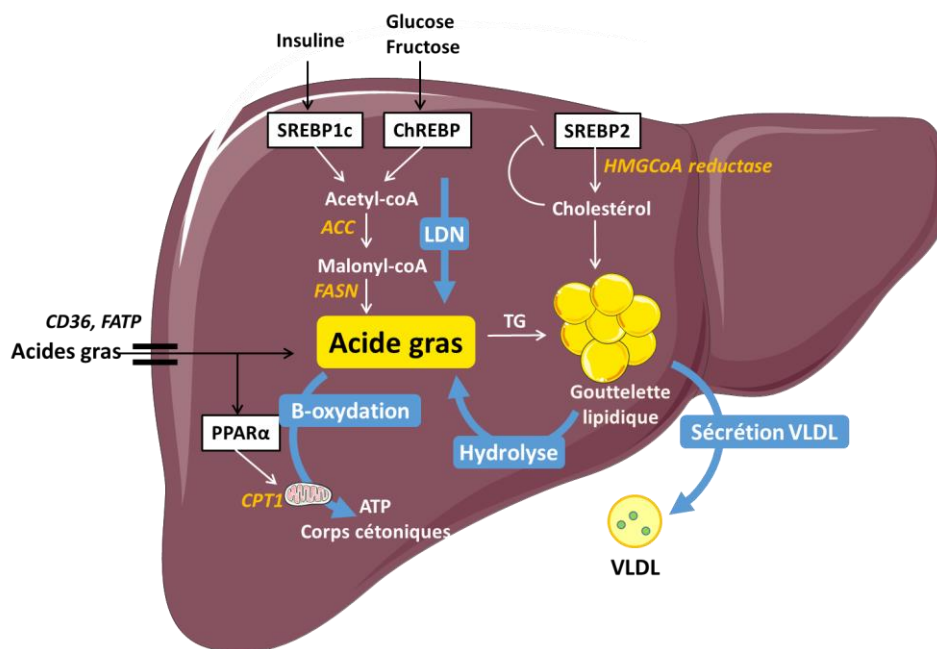


Figure 13 : Métabolisme des lipides dans le foie.

3. Dérégulation du métabolisme hépatique : le cas particulier de la NAFLD

Le syndrome métabolique se caractérise par la présence de différentes atteintes physiologiques parmi lesquelles, l'obésité, une glycémie à jeun élevée, l'hypertension et la dyslipidémie athérogène sont souvent observées. Au niveau hépatique, le syndrome métabolique se caractérise par une dérégulation du métabolisme glucido-lipidique à l'origine du développement d'une pathologie chronique : la NAFLD. Une partie des informations énoncées dans les sections suivantes sont tirées d'une revue que j'ai écrit avec les Dr. Joel Haas et Dr. Bart Staels, publié dans *Molecular Metabolism*⁸¹(**Annexe 1**).

3.1. Les différents stades de la NAFLD

La NAFLD est une pathologie chronique qui englobe un large spectre de pathologies hépatiques allant de la stéatose hépatique isolée à la stéatohépatite non alcoolique (*non-alcoholic steatohepatitis*, NASH) (**Figure 14**). La stéatose est considérée comme un phénomène physiologique et réversible. Lorsque cette stéatose s'accompagne de lésions hépatocellulaires (ballonisation des hépatocytes) et d'une inflammation lobulaire, on parle alors de NASH⁸². La NASH représente le stade pathologique de la NAFLD. Elle favorise le développement de la fibrose, via l'activation des cellules stellaires, fortement associée à la mortalité⁸³. Ainsi, la NAFLD peut être divisée en trois stades de gravité croissante : stéatose hépatique, NASH sans fibrose et NASH avec fibrose. A plus long terme, la NASH contribue au développement de complications hépatiques comme la cirrhose et le carcinome hépatocellulaire, mais aussi extra-hépatiques comme les maladies cardiovasculaires et le DT2. Il est en effet montré que les maladies cardiovasculaires sont la cause majoritaire de décès des patients atteints d'une NASH⁸⁴. Récemment, il a été proposé de redéfinir les NAFLD en MAFLD afin de mettre en valeur l'importance de la dysfonction métabolique plutôt que l'absence de surconsommation d'alcool dans la physiopathologie de la maladie⁸⁵.

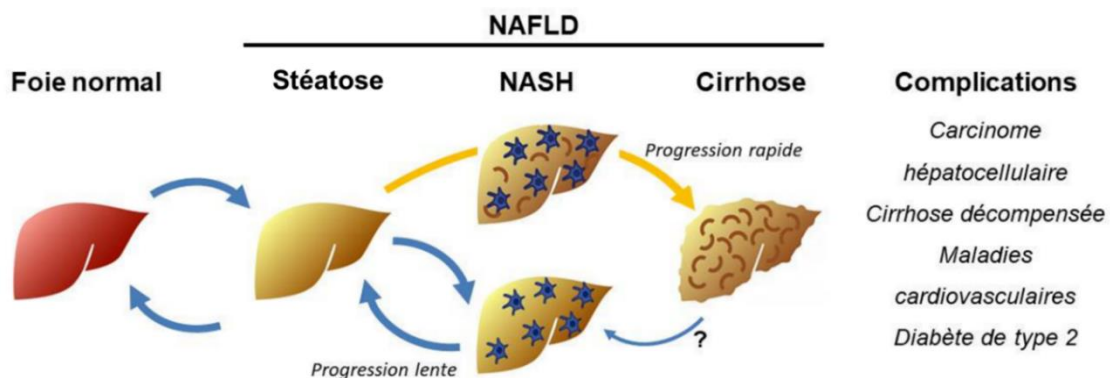


Figure 14 : Les différents stades de la NAFLD (schéma adapté de Haas et al., 2016⁸²)

3.2. Épidémiologie de la NAFLD et des maladies cardiovasculaires

La prévalence de la NAFLD est désormais estimée à près de 25% dans le monde notamment en raison de son association étroite avec l'obésité et le DT2, et elle deviendra bientôt l'indication la plus fréquente de transplantation hépatique aux États-Unis et en Europe⁸⁶. Bien que la NAFLD partage de nombreux facteurs de risque communs avec les maladies cardiovasculaires, des études suggèrent que la stéatose et la NASH ont un impact direct sur le risque cardiovasculaire. Plusieurs études récentes ont examiné le risque de survenue d'un événement cardiovasculaire dans des cohortes de patients atteints de NAFLD. Il est généralement admis que tous les stades de la NAFLD (c'est-à-dire stéatose isolée, NASH, etc) peuvent augmenter le risque d'événements cardiovasculaires tels que l'infarctus du myocarde, l'accident vasculaire cérébral (AVC) ou le décès⁸⁷⁻⁸⁹. Ces événements sont le résultat d'un dysfonctionnement du système vasculaire conduisant à l'athérosclérose. L'athérosclérose se caractérise par le développement de plaques néointimales dans les grandes artères. Ces plaques se développent progressivement sur plusieurs décennies, au cours desquelles leur composition change par le biais de processus distincts tels que le dépôt de lipides, l'inflammation, la fibrose et la calcification⁵⁸. Plusieurs études ont également démontré une augmentation de l'athérosclérose subclinique chez les patients atteints de NAFLD par la mesure de la calcification, de la rigidité aortique ou de l'épaisseur de l'intima-media de la carotide⁹⁰⁻⁹².

3.3. Physiopathologie

La progression naturelle de la NAFLD est peu connue. Il a d'abord été suggéré que la NASH se développe en 2 temps (« Two-hit hypothesis »)⁹³. Le premier événement serait le développement de la stéatose. L'accumulation hépatique de TG en elle-même n'est pas pathologique et peut même parfois être protectrice. Par contre, l'augmentation de la taille des gouttelettes lipidiques (macrosteatose) serait responsable du dysfonctionnement du métabolisme lipidique dans le foie et favoriserait le développement de la NASH. Ce changement de taille pourrait être provoqué par des modifications des espèces de phospholipides et des protéines présentes à la surface des gouttelettes. De plus, il est connu que, dans la NASH, la production d'espèces réactives à l'oxygène (ROS) augmente. La présence de ROS dans le foie va induire l'activation d'une population immunitaire clé dans le développement de la NASH : les cellules de Kupffer⁸². Le stress oxydatif serait donc le second événement capable de surpasser les mécanismes de défenses cellulaires pour produire de l'inflammation et progresser de la stéatose à la NASH⁹³. Cette hypothèse suggère un rôle autonome du foie dans le développement de la NASH. Cependant, cette

théorie n'est pas toujours en accord avec ce qui est observé en clinique. En effet, la progression de la maladie est très hétérogène. Certains patients ont une stéatose mais ne déclareront jamais de NASH alors qu'au contraire, d'autres, évolueront très rapidement vers la NASH voire vers la fibrose sans même déclarer de symptômes.

La théorie la plus probable est que la NASH se développe suite à un dysfonctionnement de plusieurs organes métaboliques (**Figure 15**). Plus particulièrement, le tissu adipeux, le muscle et l'intestin semblent jouer des rôles clés dans le développement de la NASH. Tout d'abord, outre ses effets directs dans le foie, l'insulinorésistance des tissus périphériques va également contribuer au dysfonctionnement du foie. Ainsi, dans le tissu adipeux, la perte d'inhibition de la lipolyse, lié à l'état d'insulinorésistance, entraîne une augmentation du flux d'acides gras libres et de glycérol vers le foie et fournit les précurseurs nécessaires à la formation de TG⁹⁴. Dans le muscle squelettique, elle aura pour conséquence de diminuer la captation du glucose, provoquer sa redirection vers le foie et favoriser alors la LDN⁹⁵. D'autre part, le tissu adipeux sécrète plusieurs adipokines tels que la leptine, dont la production est corrélée à la masse du tissu adipeux, et l'adiponectine dont les concentrations sont respectivement augmentées et diminuées dans la circulation chez les patients atteints de NAFLD. Ces deux adipokines ont un effet bénéfique sur la sensibilité à l'insuline et ont des propriétés anti-stéatosique⁹⁶. Il est montré en effet, que l'injection de leptine favorise la réduction de la concentration intra-hépatique de TG chez les rats en condition physiologique⁹⁷. Toutefois, chez les rats obèses, l'injection de leptine n'est pas efficace⁹⁷, suggérant qu'une résistance à la leptine pourrait être responsable de la perte de l'effet bénéfique de cette adipokine sur la stéatose en contexte d'obésité. La leptine exerce, de plus, des propriétés pro-inflammatoires et pro-fibrotiques qui deviennent alors délétères dans le contexte de la NAFLD. Le tissu adipeux produit également des cytokines pro-inflammatoires, via les cellules immunitaires infiltrées dans le tissu adipeux, comme le *tumor necrosis factor α* (TNF- α) et l'interleukine 6 (IL-6)⁹⁶.

Plusieurs études ont également mis en évidence l'importance du microbiote intestinal dans le développement de la NASH. Il est montré, d'une part, que les patients atteints de NASH possèdent plus de bactéries productrices d'alcool au sein de leur microbiote. En raison des nombreux échanges entre l'intestin et le foie, via la veine porte, ces alcools contribuent à la génération de ROS dans le foie et favorisent l'inflammation⁹⁸. D'autre part, la rupture des jonctions serrées des entérocytes favorise l'augmentation de la perméabilité intestinale qui corrèle avec la sévérité de la stéatose chez les patients atteints de NAFLD.^{99,100} L'augmentation de la perméabilité intestinale pourrait ainsi faciliter la translocation des bactéries de l'intestin vers le foie et favoriser le développement de l'inflammation bien que ce

lien de causalité n'a pas été prouvé. En effet, bien que qu'on observe une prolifération et une modification de la composition du microbiote intestinale ainsi qu'une augmentation de la perméabilité intestinale chez les patients atteints de NAFLD, ces éléments ne corrèlent pas avec la fibrose et l'inflammation hépatique.

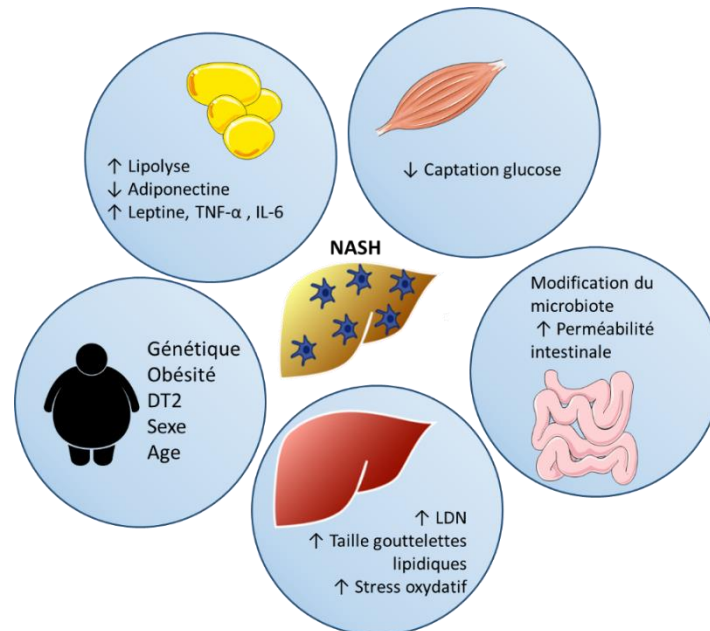


Figure 15 : Résumé des mécanismes favorisant le développement de la NAFLD.

3.4. Facteurs génétiques associés au développement de la NAFLD

Un certain nombre d'études génétiques ont identifié des variants de plusieurs gènes impliqués dans le contrôle du métabolisme lipidique associés à un risque accru de développement de la NAFLD. Parmi les plus fréquents, on retrouve des mutations dans les gènes *PNPLA3*^{101,102}, *transmembrane 6 superfamily member 2 (TM6SF2)*^{101,103}, *farnesyl-diphosphate farnesyltransférase 1 (FDDT1)*¹⁰⁴ et *membrane bound O-acyltransferase domain containing 7 (MBOAT7)*¹⁰⁵. Des mutations dans ces gènes dérèglent le métabolisme lipidique. Le variant *PNPLA3* rs738409 I148M affecte le remodelage des chaînes d'acides gras dans les TG hépatiques¹⁰⁶ et réduit la sécrétion hépatique de VLDL¹⁰⁷ tout comme le variant *TM6SF2* rs58542926 E167K¹⁰³. Le variant *MBOAT7* rs641738 affecte le remodelage de la chaîne acyle des phospholipides¹⁰⁵. Ces différents variants sont présents dans la population avec des fréquences d'allèles mineurs de 24 % pour *PNPLA3*, 7 % pour *TM6SF2* et 43 % pour *MBOAT7* (selon les données du consortium CARDIoGRAMplusC4D¹⁰⁸). Cependant, bien que des hypothèses suggèrent que la stéatose se développe suite à une augmentation de la LDN et du flux d'acides gras dérivés des tissus adipeux^{109,110}, il n'existe actuellement aucune donnée reliant ces variants aux fonctions du tissu adipeux. De manière inattendue, les polymorphismes génétiques associés à la NAFLD ont plutôt tendance à diminuer les facteurs de risques de maladies cardiovasculaires. Les variants à risque,

PNPLA3 et *TM6SF2*, sont associés à un profil lipoprotéique favorable, caractérisé par des concentrations plasmatiques de TG et/ou de LDL-C faibles^{111,112}. Plusieurs études ont montré une modeste protection des porteurs du variant de *TM6SF2* E167K contre le développement des maladies cardiovasculaires^{111,113}. Le variant *PNPLA3* I148M ne semble pas avoir d'impact sur le développement de ces pathologies^{108,114}. Dans l'ensemble, ces résultats indiquent un rôle important de la dyslipidémie induite par la NAFLD en tant que facteur de risque des maladies cardiovasculaires.

3.5. Développement de la dyslipidémie chez les patients atteints de NAFLD

La NASH est fortement associée aux maladies cardiovasculaires qui sont la cause la plus fréquente de décès chez les patients atteints de NASH⁸⁴. Les altérations du métabolisme lipidique qui conduisent à la NAFLD favorisent également le développement de dyslipidémies athérogènes^{70,72,73}, notamment des concentrations élevées de TG plasmatiques, de *remnants* riches en cholestérol et de particules sdLDL qui vont infiltrer la paroi artérielle et favoriser le développement de plaques d'athérome. L'altération du métabolisme du glucose et la résistance à l'insuline, caractéristiques de la NAFLD, peuvent aggraver davantage le risque de maladies cardiovasculaires chez ces patients.

3.5.1. Surproduction de VLDL

Les patients atteints de NAFLD présentent souvent une hypertriglycéridémie⁷⁰⁻⁷³ et des concentrations élevées de *remnants* indiquant un métabolisme intravasculaire des TG retardé¹¹⁵. Cette hypertriglycéridémie s'explique en partie par le fait que la concentration intrahépatique de TG est directement corrélée à la production hépatique de VLDL chez les patients obèses non diabétiques^{116,117}. Toutefois, si la concentration intrahépatique de TG est trop élevée (>10%), cette corrélation est perdue. Au-delà de cette limite de 10%, il est possible que le ratio entre les TG et les phospholipides, composants de surface des VLDL, ne puisse plus être maintenu perturbant ainsi la production de VLDL visant à compenser cette augmentation de la production de TG hépatiques (**Figure 16-1**). De plus, en condition physiologique, l'insuline inhibe la production hépatique de VLDL⁹⁴. Cependant, chez les patients atteints de NAFLD, l'hyperinsulinémie augmente la sécrétion de VLDL-TG¹¹⁸ indiquant une perte de l'inhibition de l'insuline sur la production de VLDL.

3.5.2. Diminution de la clairance intravasculaire des particules riches en TG

Parallèlement, la résistance à l'insuline dans les stéatoses plus sévères et la NASH entraîne une réduction de la clairance plasmatique des lipoprotéines riches en triglycérides (c'est-à-

dire les *remnants* de VLDL et de chylomicrons)¹¹⁹, ce qui exacerbe l'hypertriglycéridémie chez ces patients. Chez les individus insulino-sensibles, l'insuline favorise l'activité de la LPL diminuant ainsi les concentrations plasmatiques de VLDL⁹⁴. A l'opposé, chez les patients atteints de NAFLD, les régulateurs de l'activité de la LPL sont perturbés ce qui tend à diminuer son activité lipolytique. Des niveaux élevés d'inhibiteurs de la LPL, ANGPTL3 et ANGPTL8 plasmatiques, sont ainsi mesurés chez des patients atteints respectivement de NASH ou de stéatose hépatique¹²⁰⁻¹²³. Au contraire, alors que les variants de l'ApoC3, un inhibiteur majeur de la LPL, affectent clairement les niveaux de TG plasmatiques, toutes les études ne démontrent pas un impact sur le développement de la stéatose hépatique¹²⁴⁻¹²⁷. Ainsi, l'ApoC3 joue plus probablement un rôle dans la dyslipidémie associée à la NAFLD. D'un point de vue mécanistique, l'ApoC3 est activée transcriptionnellement par le glucose¹²⁸ et réprimée par PPAR α , lui-même réduit chez les patients atteints de NASH¹²⁹. La clairance modulée par l'ApoC3 expliquant environ 75% de la variation des TG plasmatiques chez les patients obèses non-diabétiques¹³⁰, ces résultats soutiennent l'idée que la NAFLD favorise l'augmentation de la transcription de l'ApoC3, réduisant ainsi la clairance des lipoprotéines riches en TG. D'autre part, les patients atteints de stéatose hépatique présentent une activité de la CETP plus élevée qui, en enrichissant les VLDL en cholestérol, favorise la formation de sdLDL après l'hydrolyse des TG par la HL (**Figure 16-2**)^{131,132}. Tous ces facteurs expliquent la coexistence de la stéatose hépatique et de l'hypertriglycéridémie chez les patients atteints de NAFLD.

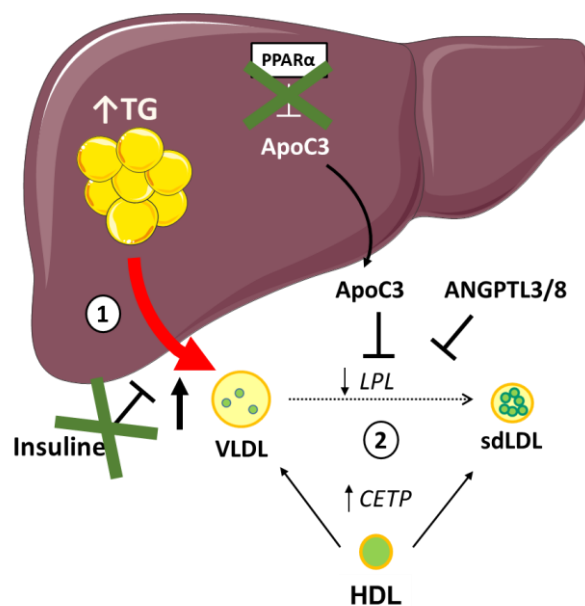


Figure 16 : Mécanismes impliqués dans le développement de la dyslipidémie dans la NAFLD.

3.6. Dérégulation du métabolisme des lipides dans la NAFLD

La progression de la simple stéatose à la NASH et à la fibrose est hétérogène et se déroule sur des années, voire des décennies. Par conséquent, les mécanismes impliqués dans l'évolution de la NAFLD sont encore mal compris. Cependant, plusieurs éléments suggèrent que les altérations du métabolisme lipidique hépatique et extra-hépatique sont des facteurs centraux (**Figure 17**)⁸⁵.

3.6.1. Dérégulation du métabolisme des TG

La LDN est considérée comme un facteur important dans le développement de la NAFLD, malgré une LDN hépatique relativement faible chez l'homme par rapport aux rongeurs. L'hyperinsulinémie dans le syndrome métabolique conduit à une LDN excessive via l'activation de la cascade LXR α -SREBP1c¹³³. De plus, la stimulation de *mechanistic targeting of rapamycin complex 1* (mTORC1) par les acides aminés, et de ChREBP par le glucose et le fructose, peut stimuler davantage cette voie. En conditions physiologiques, la signalisation modulée par mTORC1 peut compenser la perte d'action de l'insuline¹³⁴. À l'inverse, lors d'un régime riche en fructose, une déficience au niveau des récepteurs de la signalisation de l'insuline dans le foie protège de la stéatose hépatique dans des modèles murins. Des études réalisées avec des isotopes stables indiquent que la LDN hépatique est élevée chez les patients non diabétiques présentant une concentration intrahépatique de TG élevée^{109,110,135}. Celle-ci est étroitement liée à l'augmentation de la glycémie et de l'insulinémie ainsi qu'à une diminution de la sensibilité globale à l'insuline chez ces patients¹³⁵. Ces résultats suggèrent que l'hyperinsulinémie (même en l'absence de DT2 manifeste) est probablement à l'origine du développement de la stéatose dans le contexte de la NAFLD. Toutefois, savoir si l'augmentation de la LDN est réellement préjudiciable et conduit à la progression vers la NASH et la fibrose reste un sujet de débat. D'autre part, l'augmentation de la LDN va être à l'origine de l'inhibition de la β -oxydation. En effet, au cours de la LDN, la production de malonyl-CoA, un substrat pour la synthèse des lipides, réduit l'oxydation des acides gras en inhibant l'enzyme CPT1¹³⁶. La LDN est également étroitement liée à la concentration intracellulaire d'acides gras saturés¹³⁷ et à la synthèse des céramides¹³³, deux phénomènes qui conduisent à l'apoptose des hépatocytes et à une perte de sensibilité à l'insuline. À l'inverse, la déficience hépatique de la protéine ChREBP chez la souris entraîne, non seulement, une altération de la LDN, mais aussi une apparition de lésions hépatiques plus prononcées lorsque ces souris sont nourries avec un régime riche en fructose¹³⁸. Chez l'homme, l'augmentation de la LDN observée chez les patients présentant une concentration élevée de TG intra-hépatique est également associée à une

augmentation de la sécrétion hépatique de VLDL-TG¹¹⁰. Ainsi, l'augmentation de la LDN dans la NAFLD favorise l'accumulation de lipides dans le foie par la combinaison de différents processus : l'augmentation de la synthèse des TG, la diminution du catabolisme des acides gras, mais également l'augmentation de la production de VLDL-TG, favorisant ainsi la dyslipidémie.

3.6.2. Dérégulation du métabolisme du cholestérol

Plusieurs études ont montré des dérégulations des protéines impliquées dans la capture du cholestérol par le foie dans la NAFLD. Chez l'homme, la concentration plasmatique de PCSK9 est augmentée chez les patients présentant une stéatose hépatique^{139,140}. Il est montré que le développement de la stéatose hépatique, chez la souris, entraîne la diminution de l'expression du LDLR à la surface des hépatocytes et augmente les concentrations plasmatiques de l'ApoB et du cholestérol de façon dose dépendante à PCSK9¹³⁹. En effet, l'augmentation des lipides intracellulaires induit un stress du RE qui peut activer SREBP2, un activateur transcriptionnel de PCSK9¹³⁹. De plus, il est montré que la déficience en PCSK9 exacerbe le développement de la stéatose hépatique chez les souris nourries avec un régime riche en graisses (60% lipides/kcal)¹⁴¹. Ces résultats mettent en évidence le double rôle de PCSK9. En diminuant l'absorption du cholestérol par l'inhibition du LDLR, PCSK9 protège le foie d'une accumulation excessive de cholestérol intrahépatique. Cependant, cela entraîne une augmentation des concentrations plasmatiques de LDL-C, et donc un risque accru de maladies cardiovasculaires. D'autre part, chez l'homme, une faible expression de LRP1 dans le foie est associée à un mauvais pronostic du carcinome hépatocellulaire, une complication de la NAFLD¹⁴². Des études précliniques suggèrent que l'absence de LRP1 dans le foie favorise l'accumulation de cholestérol hépatique, augmente la mort cellulaire et favorise l'activation des cellules stellaires¹⁴³. D'autre part, la signalisation de l'insuline induit fortement la translocation de LRP1 vers la membrane, ce qui met en évidence un autre mécanisme par lequel la résistance à l'insuline pourrait contribuer à l'accumulation des *remnants* dans le plasma chez les patients atteints de NAFLD¹⁴⁴. Collectivement, ces données suggèrent que la dérégulation des récepteurs modulant la capture hépatique du LDL-C induit des lésions hépatiques en favorisant l'augmentation du cholestérol intracellulaire.

La dérégulation du métabolisme du cholestérol intracellulaire est également associée à la sévérité de la NASH chez l'homme et l'excès de cholestérol alimentaire entraîne une inflammation hépatique dans des modèles murins de NASH¹⁴⁵. Les mécanismes expliquant ces résultats sont probablement complexes. Toutefois, des expériences *in vitro* montrent que l'augmentation du cholestérol intracellulaire lors d'un traitement par des LDL provoque des

lésions mitochondriales et induit plusieurs signes de lipotoxicité tels que l'apoptose, la nécrose et le stress oxydatif¹⁴⁶. Récemment, le régulateur transcriptionnel tafazzine (TAZ) a été identifié comme une autre voie sensible au cholestérol impliquée dans la progression de la NASH¹⁴⁷. L'excès de cholestérol intracellulaire stabilise TAZ, qui à son tour active l'expression de gènes pro-fibrotiques dans les hépatocytes. Ces études mettent en évidence un rôle important des altérations de l'homéostasie du cholestérol intracellulaire comme moteur de la NASH.

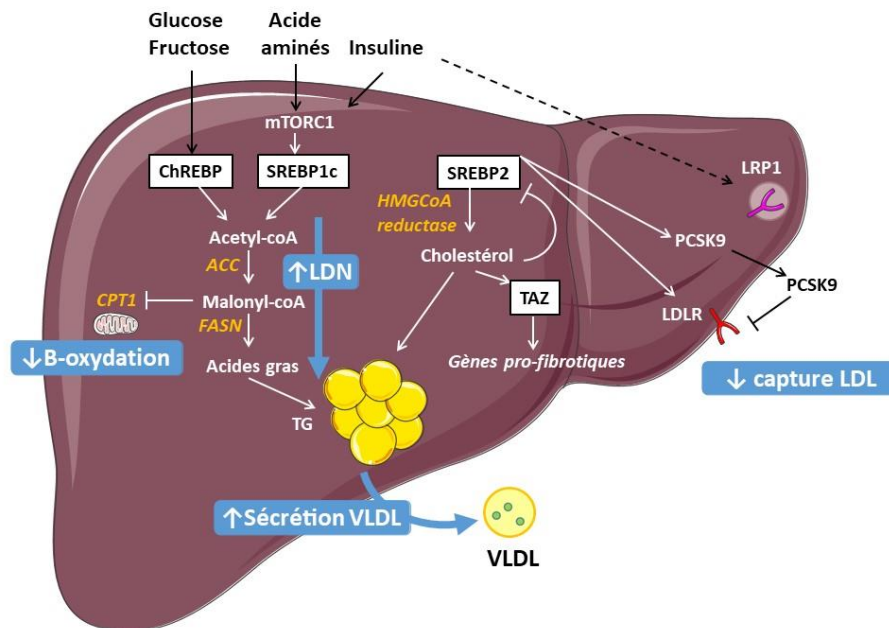


Figure 17 : Altérations du métabolisme lipidique dans le foie favorisant le développement de la NAFLD

3.7. Traitements de la NASH

3.7.1. Modification du style de vie

Les interventions sur le mode de vie, telles que la modification du régime alimentaire et l'augmentation de l'activité physique, sont les bases de la prévention et du traitement de la NAFLD. Plusieurs stratégies d'intervention diététique ont été testées : modification de la composition du régime (par exemple, régime méditerranéen, pauvre en glucides, pauvre en lipides et cétogène) ou du comportement alimentaire (c'est-à-dire alimentation restreinte dans le temps ou jeûne intermittent), le régime méditerranéen présentant les résultats les plus prometteurs pour réduire la stéatose hépatique, la dyslipidémie et d'autres comorbidités métaboliques¹⁴⁸. L'augmentation de l'activité physique est également prometteuse pour améliorer la stéatose hépatique et les comorbidités associées comme le surpoids, la dyslipidémie et l'insulinorésistance^{149,150}. Dans l'ensemble, ces études indiquent que des

réductions à court terme de la stéatose hépatique et des améliorations des facteurs de risque de maladies cardiovasculaires peuvent être obtenues même suite à une faible perte de poids. Cependant, une perte de poids plus importante (>7 %) semble être nécessaire pour obtenir la résolution de la NASH^{151,152} et la régression de la fibrose n'a été observée qu'après une perte de poids supérieure ou égale à 10 %¹⁵².

3.7.2. La chirurgie bariatrique

La chirurgie bariatrique est très efficace pour traiter la stéatose hépatique et la NASH, en tant qu'alternative au régime alimentaire et à l'exercice physique, en particulier dans le contexte d'une obésité sévère et morbide. La chirurgie bariatrique désigne plusieurs types d'interventions chirurgicales qui restreignent mécaniquement l'apport alimentaire, notamment le bypass gastrique (le plus souvent Roux-en-Y), l'anneau gastrique et la sleeve gastrectomie. Il a été démontré que le bypass gastrique et l'anneau gastrique améliorent significativement les caractéristiques histologiques de la NASH un¹⁵³ et cinq¹⁵⁴ ans après l'intervention et diminuent progressivement la fibrose chez les patients atteints de NASH¹⁵⁵. Le bypass gastrique est l'intervention la plus efficace pour améliorer la NASH¹⁵³, en corrélation avec le degré de perte de poids. Les deux études ont également constaté des améliorations durables de la dyslipidémie, de la résistance à l'insuline et des marqueurs de l'inflammation systémique, indiquant que le risque de maladies cardiovasculaires peut également être réduit. Malgré ces avantages, la chirurgie bariatrique n'est pas sans risques¹⁵⁶ et il est peu probable qu'elle devienne un traitement universel des maladies métaboliques, y compris la NAFLD.

3.7.3. Traitements pharmacologiques

Il n'existe actuellement aucune thérapie pharmacologique approuvée pour la NASH. Cependant, plusieurs essais cliniques de phase 2 et de phase 3 évaluant des stratégies axées sur le métabolisme sont en cours (**Figure 18**). Un grand nombre de médicaments candidats proposés, ou testés, pour le traitement de la NASH sont des agonistes des récepteurs nucléaires ou des analogues d'hormones afin de stimuler les voies métaboliques pour réduire l'accumulation de lipides et diminuer les lésions hépatiques. Il est intéressant de noter que la majorité de ces composés ont également montré une protection contre le développement de l'athérosclérose dans des études précliniques.

3.7.3.1. *Modulateurs du métabolisme des acides biliaires*

3.7.3.1.1. Agonistes de FXR

Le *farnesoid X receptor* (FXR) est un récepteur nucléaire activé par les acides biliaires qui est fortement exprimé dans le système entéro-hépatique. En plus de supprimer la synthèse des acides biliaires, l'activation de FXR protège contre l'accumulation des lipides dans le foie en diminuant la lipogenèse et en favorisant l'oxydation des acides gras, mais protège également de l'inflammation en inhibant le *nuclear factor kappa B* (NF-κB)¹⁵⁷. L'acide obeticholique (OCA) est un agoniste stéroïdien semi-synthétique de FXR. Bien qu'une résolution complète de la NASH n'ait pas été observée, les données des essais de phase 2 (FLINT) et de phase 3 (REGENERATE) indiquent que le traitement par OCA améliore la fibrose sans aggraver la NASH (NCT02548351). Malheureusement, ces avantages sont associés à une augmentation du LDL-C d'environ 20 mg/dL^{158,159}. Le cilofexor (NCT02854605), un agoniste non stéroïdien du FXR ciblant l'intestin, semble également diminuer la stéatose hépatique (évaluée par imagerie) mais sans augmenter le LDL-C¹⁶⁰. La stimulation de FXR semble donc avoir un potentiel pour le traitement de la fibrose dans la NASH. Toutefois, ces composés nécessitent des ajustements pour améliorer le profil de risque métabolique et cardiovasculaire surtout sachant que cette population est déjà à risque élevé.

3.7.3.1.2. Analogues du FGF19

L'analogue non tumorigène du *fibroblast growth factor* (FGF) 19, NGM282, est également en cours d'évaluation pour le traitement de la NASH (NCT02443116). Le FGF19 est une hormone produite par l'intestin grêle dont l'expression est régulée par FXR. Elle exerce diverses actions aboutissant à la réduction de la synthèse des acides biliaires mais aussi à la diminution des TG hépatiques et plasmatiques¹⁶¹. Par ailleurs, la concentration circulante de FGF19 est diminuée chez les patients atteints de NASH¹⁶². Dans deux essais de 12 semaines, un traitement au NGM282 a amélioré tous les paramètres histologiques de la NASH et de la fibrose et a réduit la concentration plasmatique de transaminases mais, comme l'OCA, il a augmenté la concentration de LDL-C^{163,164}. Des essais de phase 3 de plus grande envergure sont en cours.

3.7.3.1.3. Futures orientations des traitements ciblant les voies des acides biliaires

Le volixibat (un inhibiteur de la réabsorption des acides biliaires) diminue le cholestérol total plasmatique et le LDL-C, mais n'améliore pas la NASH dans l'analyse intermédiaire d'un essai de phase 2 (NCT02787304)¹⁶⁵. Enfin, les séquestrants d'acides biliaires, tels que le

colesevelam et la cholestyramine, améliorent le métabolisme du glucose dans le DT2 et réduisent le risque cardiovasculaire sans améliorer l'histologie du foie (NCT01066364)¹⁶⁶.

3.7.3.2. Agonistes de PPAR

Il existe actuellement plusieurs essais cliniques évaluant les agonistes de différents membres de la famille des PPAR pour le traitement de la NASH. Cette famille est composée de trois isoformes, PPAR α , PPAR β/δ et PPAR γ , ayant des fonctions partiellement similaires dans le contrôle du métabolisme des lipides et du glucose¹⁶⁷. Chaque isoforme PPAR peut être spécifiquement activée par des agonistes synthétiques. Par exemple, les fibrates (agonistes PPAR α) et les thiazolidinediones (TZD, agonistes PPAR γ) sont respectivement utilisés dans le traitement de l'hyperlipidémie et du diabète.

3.7.3.2.1. Agonistes PPAR simples

L'expression hépatique de PPAR α est diminuée dans la NASH. A l'inverse, elle est restaurée lors de la résolution de celle-ci¹²⁹. L'activation de cette voie apparaît alors comme une approche thérapeutique intéressante. Toutefois, plusieurs études ont révélé une faible efficacité en terme d'amélioration histologique de la NASH avec les fibrates de première génération tels que le fénofibrate, le gemfibrozil ou le clofibrate, et ceci malgré une amélioration des profils lipidiques¹⁶⁸. Le pemafibrate, un nouvel agoniste de PPAR α , est actuellement évalué pour le risque cardiovasculaire dans l'essai PROMINENT (NCT03071692). Des études sur la NASH évaluée par des méthodes non invasives sont en cours.

Les TZD, comme la pioglitazone et la rosiglitazone, sont des agonistes de PPAR γ utilisés chez les patients atteints de DT2 pour augmenter la sensibilité périphérique à l'insuline. En raison de la forte interaction entre le DT2 et la NAFLD, plusieurs essais ont testé leur capacité à améliorer la NASH. Alors que le traitement par la rosiglitazone réduit la stéatose et la concentration plasmatique de transaminase, il n'améliore pas l'inflammation lobulaire, la ballonnisation ni la fibrose^{169,170}. A l'inverse, la pioglitazone améliore toutes les caractéristiques histologiques de la NASH et de la fibrose, et améliore également la dyslipidémie^{171,172}. Toutefois, des études ont montré que ces traitements sont associés à une augmentation du risque d'insuffisance cardiaque et à une augmentation du poids corporel.

Le seladelpar est un agoniste de PPAR δ dont l'essai clinique de phase 2 (NCT03551522) a été prématurément interrompu en raison de la présence d'une inflammation hépatique anormale au cours de l'analyse intermédiaire, apparemment sans lien avec le traitement par le seladelpar. Un autre essai chez des patients présentant une dyslipidémie mixte a montré

que le seladelpar améliore la dyslipidémie, la sensibilité à l'insuline et diminue les marqueurs de souffrance hépatique¹⁷³.

3.7.3.2.2. Agonistes PPAR doubles et triples

Différentes combinaisons d'agonistes PPARs, qui tirent parti des actions complémentaires de chaque isoforme, sont également en cours d'évaluation pour la NASH.

Dans une étude de phase 2b, l'elafibranor, un agoniste PPAR α/δ , démontre des améliorations de la ballonisation et de l'inflammation lobulaire sans aggravation de la fibrose, bénéfiques plus apparents chez les patients présentant une NASH sévère (NCT01694849)¹⁷⁴. Cependant, les résultats provisoires de la phase 3 récemment publiés n'ont pas montré de différences statistiquement significatives dans la résolution de la NASH entre l'elafibranor et le placebo.

Le saroglitazar est un agoniste PPAR α/γ , autorisé pour le traitement de la NASH en Inde, fait actuellement l'objet d'essais cliniques de phase 3 aux États-Unis et en Europe (NCT03061721).

Récemment, le lanifibranor, un triple agoniste PPAR $\alpha/\gamma/\delta$, a atteint les critères d'évaluation primaires et secondaires en diminuant de manière significative le score *steatosis activity fibrosis* (SAF), en résolvant la NASH et en réduisant la fibrose dans l'essai de phase 2b NATIVE (NCT03008070).

3.7.3.2.3. Analogue du FGF21

Le FGF21, une hépatokine dont l'expression est régulée par PPAR α , présente de nombreuses actions métaboliques favorables, notamment l'amélioration de l'oxydation des acides gras, la réduction de la LDN, l'amélioration de la dyslipidémie et l'augmentation de la sensibilité à l'insuline¹⁷⁵. Un analogue recombinant du FGF21 humain, la pegbelfermin (NCT02413372), a montré une réduction de la stéatose hépatique (évaluée par des méthodes non invasives), des concentrations plasmatiques de transaminases et une amélioration de la dyslipidémie dans une étude de phase 2 chez des patients atteints de NASH¹⁷⁶.

3.7.3.3. *Agonistes du récepteur β des hormones thyroïdiennes*

Les hormones thyroïdiennes (TR) régulent plusieurs voies du métabolisme lipidique hépatique principalement par le biais de leur récepteur β (TR- β), l'isoforme majeure présente dans le foie. Dans la NAFLD, l'activation du TR- β induit la captation et l'oxydation des acides gras et améliore la biogenèse et l'activité des mitochondries. L'activation du TR- β favorise

également le mécanisme d'endocytose par le LDLR et le transport inverse du cholestérol¹⁷⁷. Deux agonistes sélectifs de TR- β sont à l'étude pour la NASH, le resmetirom (NCT02912260) et le VK2809 (NCT04173065) employant des mécanismes pharmacologiques distincts au niveau de la sélectivité hépatique. Le traitement par resmetirom améliore la dyslipidémie, diminue la teneur en lipides du foie (évaluation par imagerie) et le *NAFLD activity score* (NAS) sur la biopsie chez les patients atteints de NASH avec fibrose (stades 1 à 3)¹⁷⁸. L'évaluation de l'efficacité du VK2809 est en cours.

3.7.3.4. *Autres traitements*

Les statines, des inhibiteurs de l'enzyme HMG-coA réductase, ont été étudiées en tant que traitement potentiel de la NASH en raison de leur action hypocholestérolémiante et de la réduction du risque de maladies cardiovasculaires. Les premières études ont montré des résultats prometteurs : une diminution des concentrations plasmatiques de transaminases ou une réduction de la stéatose mesurée par échographie¹⁷⁹. Cependant, des essais randomisés évaluant l'impact des statines sur la NASH en utilisant des critères histologiques font défaut. D'autre part, une analyse transcriptomique de biopsies hépatiques de patients obèses a révélé que le traitement par statine est associé à une augmentation de l'expression de gènes impliqués dans la LDN¹⁸⁰. Dans l'ensemble, si les statines sont des médicaments sans danger à utiliser chez ces patients, on peut douter qu'elles améliorent également la NAFLD.

L'analogue du *glucagon-like peptide-1* (GLP1), le liraglutide, utilisé pour le traitement du DT2, s'est révélé prometteur pour le traitement de la NASH en diminuant le poids corporel et la glycémie à jeun chez 9 patients atteints de NASH (NCT01237119)¹⁸¹, incitant à une confirmation dans des études plus larges utilisant des critères histologiques. Compte tenu de l'absence d'expression du récepteur au GLP1 dans les hépatocytes, la manière dont les analogues du GLP1 améliorent la NAFLD (soit par des actions non parenchymateuses sur le foie, soit par l'amélioration de la sensibilité systémique à l'insuline et la perte de poids) n'est pas clairement défini.

L'augmentation de la LDN systématiquement observée chez les patients atteints de NASH constitue également une cible thérapeutique¹⁰⁹. En effet, une étude en phase 2 avec le firsocostat, un inhibiteur de l'ACC1/ACC2, réduit la stéatose hépatique chez ces patients. Toutefois, cet effet bénéfique s'accompagne d'une augmentation de la concentration plasmatique de TG liée à l'augmentation des particules VLDL (NCT02856555)¹⁸².

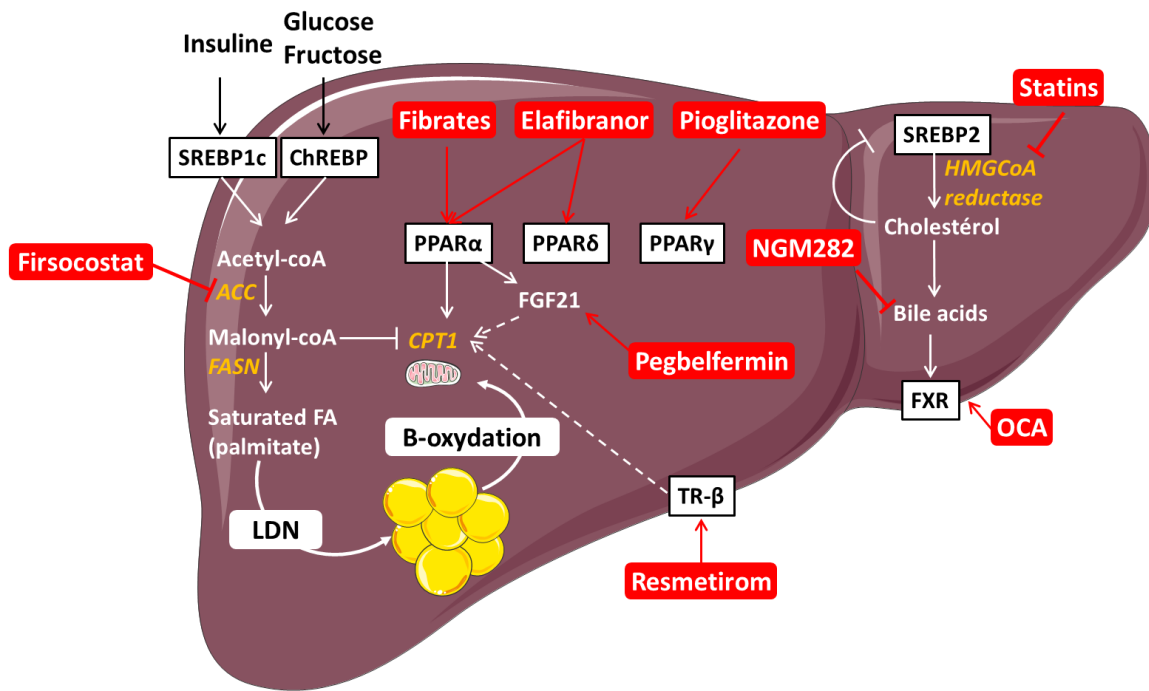


Figure 18 : Résumé des principaux traitements pharmacologiques de la NASH ciblant le métabolisme.

A ce jour, les différentes stratégies utilisées contre la NASH n'ont clairement pas démontré leurs efficacités thérapeutiques, bien qu'il soit, toutefois, rapporté dans quelques essais cliniques, une amélioration de la dyslipidémie. Néanmoins, une évaluation détaillée des complications cardiovasculaires fait défaut et, dans plusieurs études à court terme, les changements dans les profils lipidiques plasmatiques ne sont pas rapportés. L'identification des patients atteints de NASH présentant un risque cardiovasculaire important et leur prise en charge adéquate restent un défi majeur.

Partie 3 : L'Apolipoprotéine F

Afin d'identifier des gènes cibles potentiellement impliqués dans la pathogénèse de la NAFLD chez l'homme, le laboratoire U1011 a réalisé une analyse transcriptomique de biopsies de foie de patients issus d'une cohorte humaine de NAFLD (RESOLVE, Anvers¹⁸³). Cette analyse a identifié l'ApoF comme le transcrit le plus inversement corrélé avec le niveau de stéatose chez l'homme. Son expression est en effet réduite de moitié chez les patients atteints d'une NASH par rapport aux sujets contrôles. A l'inverse, chez les patients présentant une amélioration histologique de la NASH lors d'un changement d'alimentation ou après une chirurgie bariatrique, l'expression de l'ApoF est restaurée. Ces résultats semblent indiquer que l'ApoF puisse être un facteur potentiellement impliqué dans le développement de la NAFLD et/ou ses complications.

1. Généralités sur l'ApoF

1.1. Structure de l'ApoF

L'ApoF est une protéine de 29 kDa issue du clivage d'un précurseur de 326 acides aminés. Elle contient plusieurs sites de O- et N-glycosylation lui conférant une masse moléculaire 40% supérieure à sa masse prédite¹⁸⁴. L'isoforme humaine de l'ApoF possède 3 sites de N-glycosylation qui sont absents dans l'isoforme murine de l'ApoF (**Figure 19**). Les séquences d'acides aminés de ces deux isoformes ne présentent qu'environ 60% d'homologie, la majorité de leurs différences se situant dans la portion C-terminale de la protéine¹⁸⁵. L'ApoF a été décrite pour la première fois en 1978 par Oloffsson *et al* dans la fraction HDL du plasma humain¹⁸⁶. Néanmoins, la structure de l'ApoF diffère des apolipoprotéines classiquement associées aux HDL (comme ApoA1, ApoA2 ou ApoE) puisqu'elle ne contient pas d'hélice α amphipatique permettant la liaison aux lipides⁷.

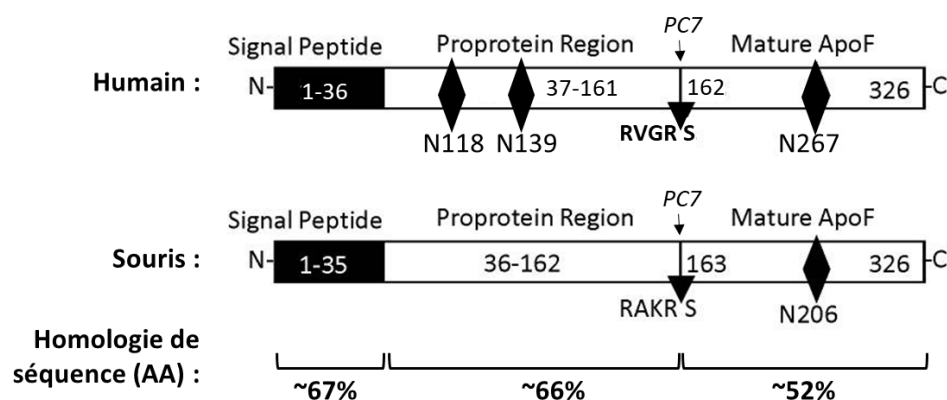


Figure 19 : Structure des isoformes humaines et murines de l'ApoF (adapté de Lagor et al., 2012¹⁸⁷).
(AA : Acide aminés ; PC7 : proprotein convertase 7)

1.2. Localisation de l'ApoF

L'ApoF est majoritairement produite par le foie¹⁸⁷. Elle est sécrétée dans le sang après clivage de sa proprotéine par la *proprotein convertase 7 (PC7)*¹⁸⁸. Dans la circulation, on la retrouve à la surface des particules LDL et HDL^{185,189-191}. Plus précisément, l'ApoF serait présente majoritairement sur les HDL₃ (pauvre en cholestérol). Elle est peu présente sur les HDL₂ (riches en cholestérol)^{185,189} bien que toutes les études ne soient pas d'accord à ce sujet¹⁹¹. L'ApoF ne semble pas présente dans la fraction VLDL^{185,189,192} même si une étude a montré sa présence sur des VLDL enrichis en cholestérol¹⁹³. D'autre part, une étude visant à déterminer la composition protéique des lipoprotéines chez l'homme a également retrouvé l'ApoF sur les particules Lp(a)¹⁹⁴.

1.3. Concentration plasmatique de l'ApoF chez l'Homme

L'ApoF est une apolipoprotéine mineure des LDL et des HDL. Sa concentration moyenne dans le plasma humain est controversée. Deux études ont mesuré sa concentration en utilisant des techniques immuno-enzymatiques avec des anticorps polyclonaux ou monoclonaux sur des populations différentes. Les concentrations moyennes de l'ApoF sont respectivement de 83,5 µg/mL et de 12,5 µg/mL dans le plasma chez des sujets sains^{189,195}. Les concentrations plasmatiques d'ApoF sont significativement plus élevées chez les hommes que chez les femmes dans la première étude¹⁹⁵. A l'inverse, dans la seconde étude, ce sont chez les femmes que les concentrations sont plus élevées¹⁸⁹. Ces différences de quantifications de l'ApoF pourraient résulter de la surestimation de la protéine d'intérêt liée à la non spécificité des anticorps mais aussi à la non reconnaissance des protéines dégradées. Dans ce contexte, une autre équipe a optimisé une technique de dosage adaptée à la détection de protéines de faible abondance dans laquelle la spécificité et la limite de détection ont été validées par l'utilisation d'une protéine recombinante de l'ApoF. Cette étude utilise la chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC/MS-MS). Par cette technique, la concentration plasmatique de l'ApoF chez un sujet sain est de 445,2ng/mL¹⁹⁶.

Malgré l'absence d'homogénéité dans la détermination de la concentration plasmatique moyenne de l'ApoF, ces études ont montré que l'ApoF est corrélée aux concentrations plasmatiques de lipides. En effet, une première étude réalisée sur une vingtaine de patients a montré que la concentration de l'ApoF est augmentée chez les sujets hypercholestérolémiques mais inversement corrélée avec leurs concentrations plasmatiques de TG¹⁹³. Ces résultats ont été confirmés par deux autres études incluant un plus grand

nombre de patients. Ces études ont également révélé que la concentration de l'ApoF est positivement corrélée avec les concentrations plasmatiques de HDL-C^{189,195}.

2. Les fonctions de l'ApoF

A l'heure actuelle, peu d'études se sont intéressées au rôle de l'ApoF et sa principale fonction physiologique reste mal connue. Alors qu'elle a d'abord été décrite comme une protéine inhibitrice de la CETP, d'autres études ont suggéré qu'elle pourrait également favoriser l'efflux de cholestérol et inhiber la PLTP (Figure 20).

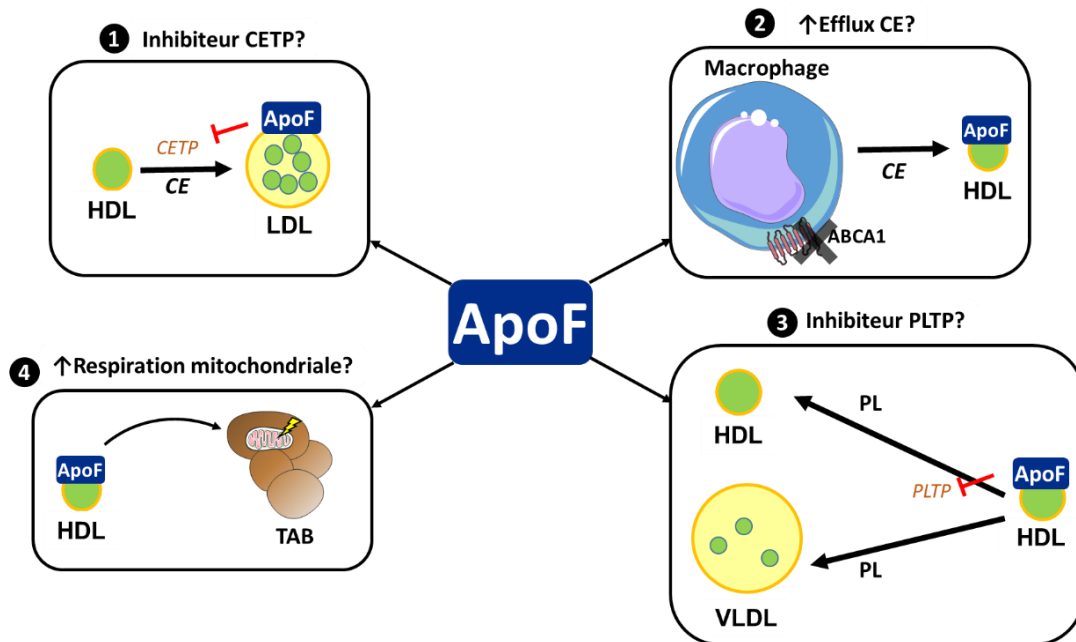


Figure 20 : Résumé des différentes fonctions décrites de l'ApoF.
(CE : cholestérol estérifié, PL : phospholipide, TAB : tissu adipeux brun)

2.1. L'ApoF : inhibiteur de la CETP ?

L'ApoF a d'abord été décrite sous le nom de *lipid transfer inhibitor protein* (LTIP)¹⁹⁰. Ce n'est qu'en 1999, que Wang et al démontrent que la LTIP et l'ApoF ne sont qu'une seule et même protéine¹⁹⁷. Initialement, l'ApoF a été décrite comme une protéine inhibitrice de la CETP. Comme décrit dans la partie II-2.3.3., la CETP facilite le transfert de cholestérol estérifié des HDL vers les VLDL et les LDL¹⁷. Chez l'homme, son activité est négativement corrélée à la concentration plasmatique de l'ApoF¹⁸⁹. Des expériences *ex vivo* réalisées à partir de plasma humain montrent que l'ApoF est capable d'inhiber le transfert de lipides entre les lipoprotéines en déplaçant la CETP de la surface des lipoprotéines^{190,198}. Plusieurs études ont de plus montré que les acides gras peuvent diminuer l'activité inhibitrice de l'ApoF sur la CETP. Ainsi, lorsque des lipoprotéines sont incubées avec de l'acide oléique ou de l'acide palmitique, l'activité inhibitrice de l'ApoF est fortement diminuée puisque celle de la CETP

est augmentée¹⁹⁹. Plus précisément, les acides gras saturés à longue chaîne seraient les plus efficaces pour inhiber l'activité de l'ApoF²⁰⁰. En effet, l'augmentation de l'interaction des acides gras libres avec les lipoprotéines perturberait leurs surfaces et entraînerait une diminution de l'activité de l'ApoF²⁰¹.

Toutefois, ces résultats n'ont été que partiellement confirmés dans d'autres modèles. C'est le cas notamment d'une étude réalisée chez des hamsters, où l'expression de l'ApoF a été diminuée par un petit ARN interférent (*small interfering RNA*, siARN). Lorsque ces lipoprotéines dépourvues d'ApoF sont incubées avec la CETP, l'activité de transfert du cholestérol estérifié est plus grande que pour les lipoprotéines possédant l'ApoF²⁰². Toutefois, après un régime enrichi en lipides et en cholestérol d'une durée de 5 jours, cette même étude a montré que l'activité de la CETP n'est pas systématiquement augmentée chez les hamsters déficients pour ApoF²⁰². Une autre étude suggère que l'action inhibitrice de l'ApoF serait spécifique du transfert de lipides de/vers les LDL et ne concernerait que faiblement les HDL^{198,203}. Étant donné que la plupart des études publiées ont montré que l'ApoF est présente en grande majorité sur les HDL et peu sur les LDL^{185,189-191}, il est possible que l'ApoF joue un rôle mineur dans l'inhibition de la CETP.

D'autres études suggèrent que le rôle inhibiteur de l'ApoF sur la CETP n'est pas sa fonction principale. En effet, si l'ApoF est capable d'inhiber la CETP, alors on peut théoriquement s'attendre à ce que la surexpression de l'ApoF aboutisse à une augmentation des concentrations plasmatiques des HDL-C et une diminution du LDL-C. Toutefois, la surexpression conjointe de la CETP et de l'ApoF par des virus adéno-associés (*adeno-associated virus*, AAV) dans le modèle de souris déficiente pour l'ApoBEC (ApoBEC -/-), la protéine responsable de l'édition de l'ApoB100 en ApoB48, ne montre pas d'inhibition de la CETP (**Figure 21A**). Au contraire, elle exacerbe la diminution du HDL-C vis-à-vis des souris ne surexprimant que la CETP¹⁸⁵. Une étude similaire a été réalisée dans le modèle de souris transgéniques pour l'ApoA1 humaine et déficientes pour LDLR et ApoBEC (ApoBEC -/-, LDLR -/-, hApoA1 Tg). Dans ce modèle, dont le profil lipoprotéique est plus proche de celui de l'homme et riche en particules LDL, la co-expression de la CETP et de l'ApoF humaine ne modifie pas les concentrations plasmatiques de LDL-C et n'augmente que très légèrement celle des VLDL-C (**Figure 21B**)¹⁸⁵.

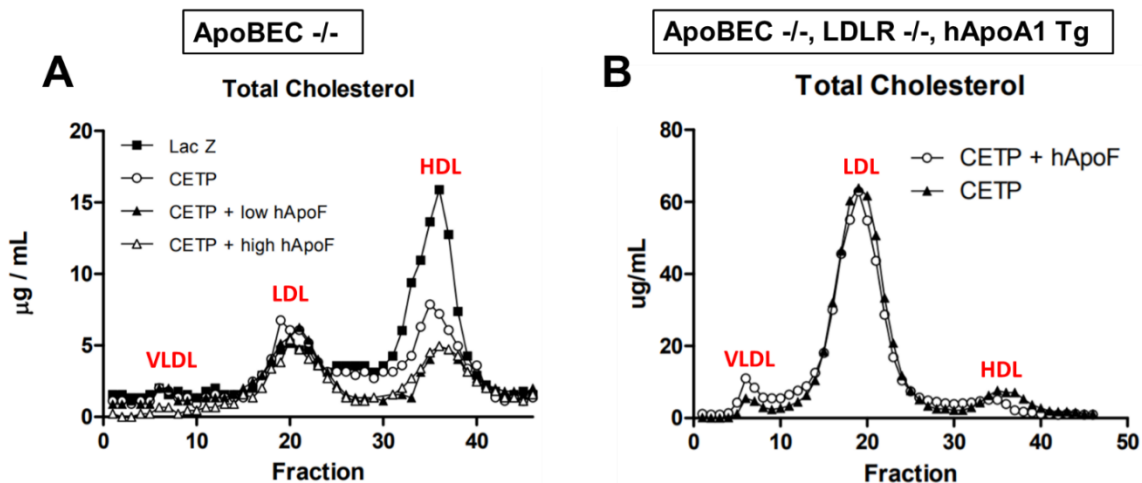


Figure 21 : La surexpression de l'ApoF ne semble pas inhiber l'activité de transfert de la CETP *in vivo* (adapté de Lagor et al., 2009¹⁸⁵).

Pour conclure, alors que les données *in vitro* montrent sans conteste l'effet inhibiteur de l'ApoF sur l'activité de la CETP, les résultats obtenus *in vivo* ne reproduisent que très peu cet effet. Cela suggère que l'ApoF ne joue pas un rôle majeur sur l'inhibition de la CETP en condition physiologique.

2.2. ApoF et transport inverse du cholestérol

Des expériences chez la souris ont permis d'identifier des fonctions de l'ApoF indépendantes de son action sur la CETP car, pour rappel, la CETP n'est pas exprimée chez le rat et la souris mais l'est chez le hamster¹⁸. Ainsi, il est montré que la surexpression hépatique de l'ApoF grâce à l'injection d'un AAV codant pour la protéine humaine ou murine de l'ApoF, est associée à une diminution des HDL-C¹⁸⁵. Chez ces souris surexprimant l'ApoF, lors de l'injection de macrophages marqués au [³H]-cholestérol, la capacité d'efflux de cholestérol par les HDL-C est augmentée par une voie indépendante de ABCA1. En effet, une augmentation de [³H] dans le foie est observée, ce qui indique une augmentation de la capture du cholestérol provenant des HDL lorsque l'ApoF est surexprimée¹⁸⁵. Une étude récente suggère également que la voie ABCA1 n'est pas impliquée dans ce mécanisme. Il est montré que des HDL reconstitués avec différentes concentrations d'ApoF ne sont pas capables d'améliorer la capacité d'efflux de cholestérol provenant de macrophages²⁰⁴. Toutefois, lors de l'injection de macrophages marqués au [³H]-cholestérol, l'augmentation de [³H] dans la bile et dans les fèces n'est pas observée suggérant que la surexpression de l'ApoF n'augmente pas la conversion du cholestérol en acides biliaires ou son excrétion dans la bile¹⁸⁵. Il semblerait donc que la surexpression de l'ApoF produit des particules HDL qui

sont de meilleurs accepteurs du cholestérol dérivés des macrophages et permet ainsi de favoriser, en partie, le transport inverse du cholestérol.

D'autres études se sont intéressées à l'influence de l'ApoF sur le métabolisme des HDL dans un modèle de souris déficientes pour l'ApoF¹⁸⁷. Il a été montré, *a posteriori*, que la délétion de l'ApoF dans ce modèle avait entraîné la délétion des gènes voisins de son locus : l'ApoN et *signal transducer and activator of transcription 2* (STAT2)²⁰⁵. Les effets observés dans ce modèle sont donc le reflet de cette triple délétion, ceux résultant spécifiquement de l'invalidation de l'ApoF ne peuvent être distingués. De manière intéressante, il est observé une diminution des concentrations plasmatiques de TG chez les souris mâles déficientes pour l'ApoF, ApoN et STAT2. D'autre part, contrairement à la surexpression de l'ApoF, ces souris ne présentent aucune différence de taille, quantité et composition lipidique et protéique de leurs HDL par rapport à celles de souris contrôles¹⁸⁷. Seule une faible diminution de l'efflux de cholestérol des macrophages par ABCA1 a été observé chez les souris mâles déficientes pour l'ApoF, ApoN et STAT2¹⁸⁷. Ces résultats suggèrent que la délétion totale de l'ApoF ne module que légèrement le transport inverse du cholestérol dans ce modèle. Il est possible que des mécanismes se soient mis en place chez ces souris pour compenser l'absence de l'ApoF ou, plus simplement, que l'ApoF joue un rôle peu important dans le métabolisme des HDL. Néanmoins, un modèle de souris déficientes spécifiquement pour l'ApoF est nécessaire pour réellement appréhender le rôle de l'ApoF dans le mécanisme de transport inverse du cholestérol.

2.3. L'ApoF : inhibiteur de la PLTP ?

Une analyse des locus à caractères quantitatifs a identifié l'ApoF comme un inhibiteur potentiel de la PLTP, une protéine qui permet le transfert de phospholipides entre les lipoprotéines²⁰⁶. Une autre étude a également montré que la concentration plasmatique de l'ApoF corrèle avec la quantité et non pas l'activité de la PLTP dans le plasma¹⁸⁹. La surexpression de l'ApoF chez la souris induit, quant à elle, une légère diminution de l'activité PLTP ainsi qu'une diminution de la concentration plasmatique de HDL, le substrat de la PLTP¹⁸⁵. Il est donc difficile de déterminer si la diminution de l'activité de la PLTP résulte de la surexpression de l'ApoF ou de la diminution de son substrat.

2.4. Rôle de l'ApoF sur les tissus périphériques ?

Une étude récente montre que l'ApoF joue un rôle sur les tissus périphériques. Sachant que les HDL ont des propriétés vasoprotectrices et antidiabétiques²⁰⁷, une équipe a analysé la composition protéique et lipidique des HDL provenant de patients atteints de DT2 ou de

maladies coronariennes et l'impact de leurs compositions sur le métabolisme de divers types cellulaires. Cette étude a mis en évidence que les HDL provenant de patients atteints de DT2 était dépourvu d'ApoF par rapport aux sujets sains. Les auteurs montrent également que le traitement des cellules souches du tissu adipeux brun humain avec ces HDL diminue la capacité de respiration maximale de ces cellules. Lorsque ces cellules sont traitées avec des particules HDL reconstituées et contenant de l'ApoF, la capacité de respiration mitochondriale maximale de ces cellules est augmentée vis-à-vis des HDL dépourvues d'ApoF²⁰⁴. Ainsi, l'ApoF pourrait potentiellement stimuler la thermogénèse des adipocytes bruns.

Dans l'ensemble, bien que peu d'études se soient intéressées à identifier les rôles de l'ApoF, ces dernières suggèrent que les fonctions de l'ApoF sont relatives au métabolisme du cholestérol et plus précisément au métabolisme des HDL. De plus, sa surexpression semble bénéfique à plusieurs niveaux puisqu'elle permettrait de diminuer les concentrations plasmatiques de cholestérol mais aussi de stimuler la thermogénèse.

3. Régulation de l'ApoF

La régulation de l'expression et de l'activité de l'ApoF est encore mal connue. Diverses analyses bioinformatiques identifient la présence de sites de fixation pour plusieurs récepteurs nucléaires au niveau du promoteur de l'ApoF. Plus précisément, des sites de fixation pour les récepteurs nucléaires LXR, PPAR α ²⁰⁸ mais aussi FXR²⁰⁹ ont été identifiés (**Figure 22**). Toutefois, les différentes études menées à ce sujet sont parfois contradictoires car les locus de l'ApoF et de STAT2 sont très proches et ont un promoteur commun²⁰⁵.

3.1. Régulation par PPAR α

Le récepteur nucléaire PPAR α est un régulateur important du métabolisme lipidique dans le foie¹⁶⁷. Sachant que des sites de fixation pour PPAR α ont été identifiés dans le promoteur de l'ApoF, une étude a évalué l'impact de la stimulation de ce récepteur nucléaire sur son expression. Ainsi, un traitement par des agonistes de PPAR α (clofibrate ou GW7647) couplé à l'acide rétinoïque diminuait l'expression de l'ApoF dans une lignée d'hépatocytes humain (C3A)²⁰⁸. Toutefois, les agonistes PPAR α , comme les fibrates, sont utilisés pour traiter la dyslipidémie et induisent une diminution des concentrations plasmatiques de TG et une augmentation du HDL-C chez l'homme¹⁶⁷. Plusieurs études cliniques ont montré que les concentrations plasmatiques de l'ApoF sont négativement corrélées avec les concentrations de TG et positivement avec le HDL-C^{189,195}. De plus, il a été montré que le traitement par le fénofibrate chez l'homme est associée à une diminution de l'activité de la CETP²¹⁰ dont l'ApoF est décrite comme l'inhibiteur^{190,198,202}. Tous ces éléments sont contradictoires à une

inhibition de l'expression de l'ApoF par PPAR α . Des études complémentaires sont donc nécessaires afin de déterminer le rôle de PPAR α dans la régulation de l'expression de l'ApoF.

3.2. Régulation par le cholestérol

Plusieurs études suggèrent que l'expression de l'ApoF pourraient être modulée par une alimentation riche en lipides. En effet, l'utilisation d'un régime athérogène contenant du cholestérol et de l'acide cholique, un acide biliaire, diminue l'expression de l'ApoF chez deux différentes souches de souris SM/J et NZB/B1NJ²⁰⁶. De même, chez le hamster (qui exprime la CETP), un régime riche en acides gras saturés, supplémenté ou non en cholestérol, diminue également l'expression en ARN messager (ARNm) de l'ApoF²¹¹. Toutefois, chez la souris en fond C57Bl/6J, un effet opposé est observé. En effet, un régime riche en gras et en cholestérol augmente l'expression de l'ApoF hépatique. Il est à noter tout de même que l'expression de l'ApoF est diminuée dans un contexte d'hypercholestérolémie comme chez les souris déficientes pour l'ApoE et pour LDLR²¹².

Ces différentes études suggèrent que le cholestérol, ou ses métabolites, pourraient réguler l'expression de l'ApoF. LXR et FXR sont deux récepteurs nucléaires impliqués dans la régulation du métabolisme énergétique et sont respectivement activés par les oxystérols et les acides biliaires^{157,213}. Il a été montré qu'un traitement par le 22-hydroxycholesterol ou par le GW3965, un agoniste du récepteur nucléaire LXR, en association avec l'acide rétinoïque diminuait l'expression de l'ApoF dans la lignée d'hépatocytes C3A. D'autre part, *in vitro* et *in vivo*, un traitement par l'acide chénodésoxycholique (CDCA), un agoniste du récepteur nucléaire FXR, augmente l'expression de l'ApoF en ARNm et en protéine dans des hépatocytes en culture ainsi que dans le foie de souris C57Bl/6²⁰⁹. Ces résultats sont contradictoires avec l'étude précédemment citée démontrant une inhibition de l'expression de l'ApoF chez les souris nourries par un régime supplémenté en acide cholique²⁰⁶. De plus, ces résultats n'ont pas été reproduit dans d'autres études. Un traitement au CDCA, de plus courte durée sur une autre lignée d'hépatocytes, n'a pas modifié l'expression de l'ApoF²⁰⁸.

En conclusion, ces données semblent indiquer que LXR soit un régulateur potentiel de l'expression de l'ApoF bien que des études complémentaires restent nécessaires afin de confirmer cette hypothèse. D'autre part, l'influence d'autres facteurs de transcription régulés par le cholestérol, notamment SREBP2, devrait être envisagée.

3.3. Régulation par l'acide rétinoïque

Les études précédemment décrites proposent LXR, PPAR α et FXR comme modulateur de l'expression de l'ApoF. Ces récepteurs nucléaires peuvent requérir l'action d'un partenaire d'hétérodimérisation, le *retinoid X receptor* (RXR), activé par l'acide rétinoïque, pour induire ou réprimer l'expression de leurs gènes cibles²¹⁴. Ces études ont montré que des traitements avec des agonistes LXR ou PPAR α seuls ne sont pas capables de moduler l'expression de l'ApoF²⁰⁸ soulignant l'importance de l'activation de RXR par l'acide rétinoïque dans la régulation de l'ApoF. Il a, en effet, été montré que l'acide rétinoïque réprime l'expression de l'ApoF dans une lignée d'hépatocytes murins (AML12) et dans le foie de souris²¹⁵.

3.4. Régulation par C/EBP α et ETS

D'autres analyses bio-informatiques réalisées à partir de données générées dans une lignée d'hépatocytes (HepG2) montrent que le promoteur de l'ApoF contient des sites potentiels de liaisons pour les facteurs de transcriptions C/EBP α et ETS. Des tests d'activité luciférase ont permis de confirmer que ces facteurs de transcription sont capables d'agir en synergie pour augmenter l'activité du promoteur de l'ApoF et donc de moduler son expression *in vitro* dans les HepG2 et Huh7²¹⁶.

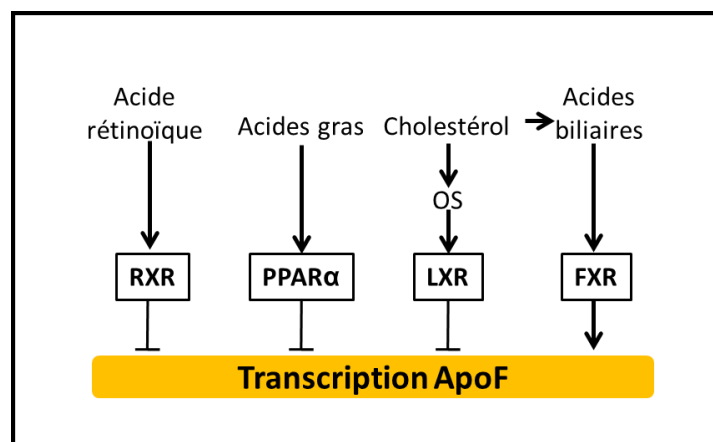


Figure 22 : Résumé des potentiels régulateurs de l'expression de l'ApoF.

Pour conclure, plusieurs études suggèrent que l'ApoF pourrait être négativement régulée par PPAR α et LXR et positivement par FXR. Toutefois, les études utilisant des agonistes de ces récepteurs nucléaires n'ont pas toujours montré des changements de lipides plasmatiques compatibles aux effets observés liés à la modulation de l'ApoF. De plus, ces récepteurs nucléaires ne semblent pas capables de réguler seul l'expression de l'ApoF suggérant que RXR pourrait jouer un rôle plus important dans cette régulation.

4. Implication de l'ApoF dans les maladies métaboliques

Jusqu'à présent, aucun polymorphisme de l'ApoF n'a été décrit comme associé à une pathologie. De plus, aucune implication directe de l'ApoF dans le développement d'une maladie n'a été démontré. Néanmoins, plusieurs études cliniques montrent que les HDL enrichies en ApoF sont associées à des effets protecteurs contre les maladies cardiovasculaires^{217,218}. Il est montré également que l'expression de l'ApoF est diminuée dans les foies de patients atteint de NASH²¹⁹ ou de carcinome hépatocellulaire²²⁰.

Objectifs de l'étude

Une analyse transcriptomique réalisée par le laboratoire U1011 sur des biopsies de foie de patients issues d'une cohorte humaine de NAFLD (RESOLVE, Anvers) a identifié l'ApoF comme un facteur potentiellement impliqué dans le développement de la NAFLD. Sachant qu'elle est présente sur les lipoprotéines plasmatiques, l'ApoF pourrait représenter un lien moléculaire important entre la NAFLD et les maladies cardiovasculaires, qui sont la cause majoritaire de décès chez ces patients.

Le but de ce projet est de déterminer si la réduction de l'expression hépatique de l'ApoF chez les patients atteints de NAFLD joue un rôle dans le développement de la pathologie. Dans un premier temps, nous avons tout d'abord tenté d'identifier de nouvelles fonctions de l'ApoF et d'établir son rôle exact dans le métabolisme des lipoprotéines. Puis, dans un second temps, nous avons étudié son rôle dans le développement de la NAFLD.

Pour cela, nous avons étudié l'influence de la modulation de l'expression hépatique de l'ApoF sur le métabolisme des lipides hépatiques et plasmatiques dans différents modèles de souris en condition physiologique et chez des souris nourries avec un régime permettant d'induire la NASH.

Matériels et méthodes

1. Données cliniques

1.1. Étude ABOS

Dans l'étude de l'Atlas Biologique de l'Obésité Sévère (ABOS), des patients adressés à l'unité de chirurgie bariatrique du CHU de Lille ont été sélectionnés pour constituer la cohorte. Tous les patients répondant aux critères d'admissibilités à la chirurgie bariatrique ont été inclus avant l'intervention. Aucune restriction alimentaire spécifique n'a été imposée avant la chirurgie. Le prélèvement sanguin a été effectué le matin de l'opération après une nuit de jeûne. Les patients devaient être âgés de 18 ans ou plus au moment de l'évaluation et répondre aux critères de la chirurgie bariatrique selon les directives nationales françaises : obésité sévère avec au moins un facteur de comorbidité (par exemple, hypertension artérielle ou DT2) depuis au moins 5 ans et échec d'un traitement médical bien conduit pendant 6 à 12 mois, comprenant une modification du mode de vie et un traitement médicamenteux approprié, absence de contre-indications médicales ou psychologiques à la chirurgie bariatrique, couverture sociale, absence de consommation importante d'alcool (consommation moyenne quotidienne maximale d'alcool de 20 g/j pour les femmes et de 30 g/j pour les hommes), et absence de consommation excessive d'alcool pendant plus de 2 ans à un moment quelconque au cours des 20 dernières années, absence de consommation à long terme de médicaments hépatotoxiques, dépistage négatif de maladies hépatiques chroniques (y compris, mais sans s'y limiter, l'hépatite virale et les maladies hépatiques auto-immunes). Un consentement écrit éclairé a été obtenu de tous les patients et l'étude a été menée conformément à la déclaration d'Helsinki. Le comité d'éthique du CHU de Lille a approuvé la cohorte (NCT01129297). Une description plus détaillée de la cohorte est fournie dans Margerie, et al. 2019¹⁸⁰.

1.2. Étude RESOLVE

Les patients se rendant à la clinique de l'obésité de l'hôpital universitaire d'Anvers dans le cadre du protocole HEPADIP ont été inclus comme décrit dans une étude précédente¹⁸³. Brièvement, les patients en surpoids (IMC entre 25-30 kg/m²) ou obèses (IMC ≥30 kg/m²) ont été recrutés entre octobre 2006 et mai 2014. Lorsque la NAFLD était suspectée, sur la base d'une analyse sanguine (alanine aminotransférase, ALAT) ou d'une échographie anormale, les patients ont été soumis à un dépistage de la présence de la NAFLD par une biopsie du foie après avoir obtenu un consentement éclairé. Le diagnostic de la NASH a été réalisé sur la base d'un système de notation histologique développé par le réseau de recherche clinique

sur la NASH qui prend en compte le score NAS et le stade de fibrose. Le score NAS peut varier de 0 à 8 et est calculé par la somme des scores de stéatose (0 à 3), d'inflammation lobulaire (0 à 3) et de ballonisation des hépatocytes (0 à 2). Un score NAS ≥ 5 est associé à un diagnostic de NASH.

2. Modèles animaux

Les souris ont été maintenues dans un environnement exempt d'agents pathogènes avec un cycle lumière/obscurité 12h:12h, d'une température de 21°C-24°C. Les souris ont été nourries avec un régime alimentaire normal contenant 8,4% de lipides, 72,4% de glucides, 19,3% de protéines (SAFE A04). Concernant les études réalisées en contexte de NAFLD, les souris sont alors nourries avec un régime riche en graisses et en sucrose supplémenté en cholestérol appelé *high fat high sucrose + cholesterol* (HFHS+chol) composé de 45% de lipides, 40% de glucides et 15% de protéines +1% cholestérol (Safe)²²¹.

Plusieurs modèles de souris ont été utilisés dans ce projet :

- Des souris C57BL/6J mâles *wild-type* (WT) âgées de 8 à 10 semaines, achetées auprès des Laboratoires Charles River (France).
- Des souris mâles humanisées pour l'ApoE2 : APOE2 *knock-in* (APOE2-KI)²²², qui expriment l'APOE2 humaine dans le locus ApoE de la souris.
- Des souris mâles déficientes pour l'ApoF (ApoF *knock-out*, ApoF-KO) et leurs contrôles (WT littermate) âgées de 12 à 14 semaines. Ces souris ont été générées en collaboration avec le laboratoire du Dr. Bart Van de Sluis (Groningen) par la méthode *clustered regularly interspaced short palindromic repeats-cas9* (CRISPR-Cas9). Un ARN guide (ARNg) a été produit pour cibler le codon ATG du premier exon du gène de l'ApoF (séquence : TTCTCAATGGCCGGACTGTA), cliver la séquence génomique par l'enzyme Cas9 et y induire une mutation permettant d'inactiver le gène de l'ApoF.
- Des souris mâles APOE*3-Leiden.CETP ont été utilisées dans le cadre d'une collaboration avec le laboratoire du Pr. Patrick Rensen (Leiden). Lors de cette étude préliminaire, les souris ont été nourries pendant 4 semaines avec un régime de type *Western diet* + 0,5% cholestérol avant la réalisation des tests fonctionnels.

La surexpression ou la réduction de l'expression de l'ApoF a été réalisée grâce à l'injection de vecteurs adénoviraux de sérotype 5 (Ad-GFP, Ad-hApoF, Ad-shLacZ et Ad-shApoF) produits chez GeneCust (Luxembourg), amplifiés et purifiés par gradient de CsCl₂ comme décrit précédemment²²³. L'Ad-GFP est composé du gène codant pour la *Green Fluorescent*

Protein (GFP). Concernant l'Ad-hApoF, il est composé du gène de l'ApoF humain ainsi que du gène rapporteur GFP. Les souris ont reçu une injection intraveineuse de 1×10^{10} particules virales purifiées dans 100µL de solution saline stérile et les analyses métaboliques ont été effectuées le 4^{ème} jour suivant l'injection.

Pour l'expérience de « Fasting-Refeeding », les souris ont été mises à jeun pendant 24h avant d'être sacrifiées (groupe « Fast ») ou ont été soumises à un régime riche en glucides et ont été sacrifiées 8h plus tard (Groupe « 8h Refed »)²²⁴. Ces échantillons ont été fournis par le Dr. Sandrine Caron.

Dans toutes les expériences, le plasma à jeun a été obtenu par un prélèvement au sinus rétro-orbital après une anesthésie à l'isoflurane en inhalation ou à la veine de la queue sans anesthésie. Toutes les expériences ont été approuvées par le Comité d'éthique pour l'expérimentation animale de la région Nord-Pas de Calais (APAFIS#5746-2016040109244171v2).

3. Tests fonctionnels *in vivo*

Pour tous les tests fonctionnels suivants, les souris ont été mises à jeun pendant 5 heures avant le début de l'expérience et un échantillon de sang a été prélevé avant le début du test.

3.1. Mesure de la sécrétion hépatique de VLDL-TG

Les taux de sécrétion hépatique de VLDL-TG ont été mesurés après l'injection intrapéritonéale de 250 µL d'une solution à 10% de poloxamère 407 (P407) dissous dans une solution saline (sigma). Des échantillons de sang ont été prélevés par la veine de la queue avant l'injection (T0) et 60, 120 et 180 min après l'injection pour mesurer l'accumulation de TG dans le plasma. Le taux catabolique fractionnel (*Fractional catabolic rate*, FCR) des TG plasmatiques a été calculé en divisant le taux de sécrétion de TG (*TG secretion rate*, TGSR) par la quantité totale de TG contenue dans la circulation²²⁵.

$$\text{Volume plasmatique (mL)} = \text{Poids corporel (g)} \times 0.033$$

$$\text{TGSR (mg/min)} = \frac{(TG(180) - TG(0)) \times \text{Volume plasmatique}}{180}$$

$$\text{FCR(pool/min)} = \frac{\text{TGSR (mg/min)}}{TG(0) \times \text{Volume plasmatique}}$$

TG(180) : taux de TG plasmatique 180 min après l'injection de P407

TG(0) : taux de TG plasmatique avant l'injection de P407

3.2. Mesure de la clairance de TG post-prandiaux

Les souris ont reçu un bolus de 400 µL d'huile d'olive par gavage. Le sang est collecté à la queue avant l'injection (T0) et 1, 2, 3 et 4 heures après l'injection pour mesurer les concentrations de TG plasmatiques. Les données sont présentées comme la différence par rapport au T0 pour les deux génotypes.

3.3. Mesure de la clairance des particules de type VLDL

La mesure de la clairance des particules de type VLDL a été réalisée en collaboration avec le laboratoire du Pr. Patrick Rensen.

Les particules de type VLDL radiomarquées sont préparées comme décrit par Berbée et al²²⁶. A la fin de la préparation, nous obtenons des particules de type VLDL correspondant à une émulsion riche en TG (80 nm) marquées avec du glycérol tri^[3H]oléate (TO) et du ^[14C]cholesteryl oleate (CO). Les souris reçoivent une injection intraveineuse de particules radiomarquées (1 mg de TG dans 200 µL de PBS). Des échantillons de sang sont prélevés après 2, 5, 10 et 15 minutes afin de quantifier la décroissance plasmatique du ^[3H]TO et du ^[14C]CO. Après 15 minutes, les souris ont été sacrifiées par dislocation cervicale et perfusées avec du PBS. Le foie, le tissu adipeux brun interscapulaire (iBAT), le tissu adipeux brun subscapulaire (sBAT), le tissu adipeux blanc gonadique (gWAT), le tissu adipeux blanc inguinal (iWAT), le cœur, la rate et le quadriceps ont été prélevés. La capture de ^[3H]TO et de ^[14C]CO par les organes métaboliques est déterminée après lyse des organes pendant une nuit à 55°C dans un solubilisateur de tissus (Amersham Biosciences, Roosendaal, Pays-Bas) et comptage de la radioactivité. Les résultats sont exprimés par gramme de tissus.

4. Etudes *in vitro*

4.1. Modèles cellulaires

Les hépatocytes humains immortalisés (*Immortalized Human Hepatocytes*, IHH) ont été cultivés dans un milieu William's à 11 mM de glucose supplémenté par 2 mM de glutamine, 20 mU/mL d'insuline bovine, 50 nM de dexaméthasone, 10% de sérum de veau fœtal (SVF) et des antibiotiques, à 37°C et 5% de CO₂. Ces cellules sontensemencées dans des plaques 6 puits à 750 000 cellules/puits ou dans des plaques 96 puits à 20 000 cellules/puits. Les cellules IHH ont été transfectées transitoirement avec un siARN dirigé contre l'ApoF (ON-TARGETplus Human APOF siRNA L-011576-00-0005) ou non-ciblé (ON-TARGETplus Non-targeting Control Pool D-001810-10-20) en utilisant le réactif de transfection Dharmafect (Dharmacon) selon les instructions du fabricant dans un milieu William's pauvre en sérum (2%) et sans antibiotiques.

Les études concernant la régulation de l'ApoF par des récepteurs nucléaires ont été réalisées sur des hépatocytes primaires humains provenant de 3 donneurs différents (BioPredic). Les hépatocytes ont étéensemencés dans un milieu William's supplémenté par 1% de glutamax, 4 µg/mL d'insuline bovine, 10% de SVF et des antibiotiques, à 37°C et 5% de CO₂. Ces cellules sontensemencées dans des plaques 12 puits à 1 000 000 cellules/puits.

Les cellules rénales embryonnaires humaines (*Human Embryonic Kidney*, HEK 293), utilisées pour la production d'adénovirus, sont cultivées dans un milieu MEM complété par 10% de SVF, à 37°C et 5% de CO₂.

4.2. Mesure de la capture des particules marquées

Le test de capture des particules marquées au 1,10-dioctadécyl-3,3,30,30-tétraméthylindocarbocyanine perchlorate (Dil) est réalisé dans les IHH. 48h après la transfection des siARN, le milieu est remplacé par un milieu William's contenant du sérum délipidé pendant 24h avant le traitement. Dans une plaque de 96 puits, les cellules sont traitées avec 10 µg de VLDL ou 1µg de LDL marquées au Dil (CliniSciences) pendant respectivement 16 et 3 heures. Après avoir éliminé le milieu, les cellules sont rinçées puis fixées avec du paraformaldéhyde à 4% et marquées avec 1 µg/mL de Hoechst (ThermoFischer Scientific). La fluorescence du Dil (Exc : 534 nm, Em : 572 nm) et du Hoechst (Exc : 365 nm, Em : 460 nm) sont ensuite quantifiées. La capture des Dil-VLDL et des Dil-LDL est exprimée par rapport au nombre de cellules estimée par le Hoechst.

4.3. Stimulation par des agonistes de récepteurs nucléaires

24h après l'ensemencement des hépatocytes primaires humains, le milieu est remplacé par le milieu William's supplémenté par 0,1% de sérum albumine bovine (BSA) et 1% de GlutaMax puis les cellules sont traitées pendant 16h avec les différents agonistes : diméthylsulfoxyde (DMSO) 0,1% (contrôle), 1 µM GW3965 (agoniste LXR), 600 nM GW7647 (agoniste PPARα) ou 1 µM GW4064 (agoniste FXR).

4.4. Stimulation par l'acide oléique, les LDL, le glucose et le TNF

L'impact de différents traitements sur la régulation de l'ApoF dans les IHH a été étudié. Les cellules ont été stimulées pendant 16h dans un milieu William's supplémenté par 0,1% BSA et 1% de glutamine selon les conditions suivantes :

- Acide oléique à 500µM d'acide oléique, 160µM de BSA.
- LDL à 200µg/mL de protéines.

- Glucose aux concentrations de 1 ou 11 mM de glucose et d'insuline à 100 nM.
- TNF α à 25 ng/mL.

5. Histologie du foie de souris

L'histologie du foie est réalisée sur le lobe médian. Après le prélèvement, le morceau de foie est immergé dans une solution de paraformaldéhyde 4%. Le morceau de foie est ensuite placé sur le processeur de tissus STP120 qui effectue les étapes de fixation, déshydratation, clarification et imprégnation. Les lobes de foies sont ensuite inclus en paraffine. Des coupes de 3 μ m d'épaisseur sont déposées sur des lames gélatinées puis une coloration hématoxyline-éosine est réalisée à l'aide de l'automate (Leica Autostainer XL). Les coupes sont ensuite observées à l'aide du microscope Nikon Ti afin d'observer la structure du tissu. Pour la microscopie confocale, les lames ont été incubées avec du Hoechst puis montées avec le *Dako Fluorescent Mounting Medium* (S3023) et visualisées avec un microscope confocal LSM 880 (Zeiss).

6. Analyses des lipides et des lipoprotéines

6.1. Dosage des lipides plasmatiques et hépatiques

Les TG et le cholestérol provenant d'extraits de lipides plasmatiques ou hépatiques ont été mesurés par colorimétrie (BioMérieux, France) selon le protocole du fabricant. Les lipides hépatiques ont été extraits par la méthode de Folch (Folch et al., 1957). Brièvement, 2 mL de chloroforme: méthanol (2 :1) sont ajoutés au broyat de foie dont la teneur en protéines (1mg par échantillons) est déterminée par la méthode BCA (Interchim). Un volume d'eau est ensuite ajouté de manière à obtenir un ratio 4:1 de chloroforme : méthanol. Les tubes sont centrifugés à 1000 rpm pendant 5 min. 1mL de phase organique est récupérée puis mélangée avec 1 mL de chloroforme – 1% triton. Les tubes sont ensuite séchés sous l'azote à 37°C puis le culot est solubilisé dans l'eau.

6.2. Séparation des lipoprotéines plasmatiques

Les fractions lipoprotéiques ont été séparées à partir de 10 à 100 μ l de plasma total (selon les expériences) par chromatographie liquide de protéine rapide (*Fast Protein Liquid Chromatography*, FPLC) avec filtration sur gel sur une colonne Superose 6 10/300 GL (GE Healthcare). L'aire sous la courbe (*Area under the curve*, AUC) de chaque fraction lipoprotéique est calculée selon la formule ci-dessous et permet la quantification du cholestérol ou des TG dans chaque fraction correspondante.

$$AUC = \frac{\text{Somme } (Tx(DO) + \dots + Ty(DO))}{Ty(\text{min}) - Tx(\text{min})}$$

6.3. Dosage de l'activité de la LPL et de la HL

Après une nuit de jeûne, les souris ont reçu une injection d'une solution d'héparine (CHOAY, 0,1 U/g de poids corporel dans une solution saline) pour libérer les lipases dans la circulation puis le plasma est collecté 10 minutes après l'injection. Les mesures de l'activité des lipases sont effectuées par le CEREMET (Université de Barcelone, Espagne) comme décrit précédemment^{227,228}. Brièvement, l'activité lipasique totale et l'activité en présence de NaCl 1M ont été mesurées. L'activité mesurée en présence de sel élevé, correspondant à la HL, est soustraite à l'activité lipasique totale pour estimer l'activité de la LPL.

7. Analyse des protéines

7.1. Western blot

Le Western blot a été réalisé sur 2µL de plasma ou 30µg de protéines pour les broyats de foie. L'extraction des membranes a été réalisée avec le kit « *Mem-PER™ Plus Membrane Protein Extraction Kit* » (Thermo Fisher Scientific) selon le protocole du fabricant. Après l'ajout du tampon de charge, les échantillons sont chauffés 5 min à 95°C puis les protéines sont déposées sur un gel de polyacrylamide « *NuPAGE 4-12% Bis-Tris-Gel* » ou « *NuPAGE 3-8% Tris-Acetate* » (Thermo Fisher Scientific). Après la migration, les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose en milieu liquide. Les membranes sont saturées dans une solution de PBS 1X + 5% de lait pendant une heure à température ambiante sous agitation puis incubées une nuit à 4°C avec l'anticorps primaire correspondant (**Tableau 3**) dans une solution de PBS + 5% lait. Après trois lavages au PBS 1X, les membranes sont incubées avec des anticorps secondaires IRDye (LI-COR Biosciences, Lincoln, USA) dilués au 1 :10000 dans une solution de PBS + 5% de lait pendant une heure à température ambiante et sous agitation. Enfin, les membranes sont révélées par fluorescence avec l'Odissey® CLx (Li-cor). Les quantifications sont réalisées à l'aide d'Image Studio Lite v5.2 (LI-COR Biosciences, Lincoln, USA).

Tableau 3 : Caractéristiques des anticorps utilisés.

Protéine	Taille	Référence	Dilution	Secondaire
ApoB	500 kDa	ab-20737	1:500	Rabbit
hApoF	29 kDa	Lagor et al., 2009	1:500	Rabbit
GAPDH	37 kDa	5174, Cell signaling	1:1000	Rabbit
Hsp 90	90 kDa	sc-7947	1:1000	Rabbit
LDLR	160 kDa	ab-52818	1:1000	Rabbit
LRP1	85 kDa	ab-92544	1:100 000	Rabbit
Pan-cadherin	130 to 150 kDa	CST, 4068	1:500	Rabbit
Syndecan 1	32 à 85 kDa	R&D, AF3190	1:200	Goat

7.2. Quantification des apolipoprotéines par LC-MS/MS

La quantification des apolipoprotéines est réalisée en collaboration avec le Dr. Mikaël Croyal (Nantes). L'ApoA1, l'ApoA2, l'ApoB, l'ApoC2, l'ApoC3 et l'ApoE sont quantifiées dans des échantillons de plasma (20 µL) après protéolyse à la trypsine et analyse par LC-MS/MS des peptides signatures comme décrit précédemment dans Blanchard *et al*, 2020²²⁹. La sélection des peptides protéolytiques a été adaptée à l'échantillon murin comme détaillé dans le **tableau 4** :

Tableau 4 : Paramètres *multiple reaction monitoring* (MRM) utilisés pour la détection de biomarqueurs peptidiques d'apolipoprotéines par spectrométrie de masse.

Apolipoprotéine	Peptide	MRM transition (m/z)	Cone/collision (V)
ApoA1	VAPLGAELQESAR	671.4 → 586.3 (y ₁₁ ²⁺)	40/23
ApoA1 (IS)	VAPLGAELQESA-[¹³ C ₆ . ¹⁵ N ₄]R	676.4 → 591.3 (y ₁₁ ²⁺)	40/23
ApoA2	THEQLTPLVR	597.7 → 955.8 (y ₈ ⁺)	40/30
ApoA2 (IS)	THEQLTPLV-[¹³ C ₆ . ¹⁵ N ₄]R	602.7 → 960.8 (y ₈ ⁺)	40/30
ApoB	INIDIPLPLGGK	625.9 → 681.5 (y ₇ ⁺)	30/24
ApoB (IS)	INIDIPLPLGGK-[¹³ C ₆ . ¹⁵ N ₂]K	629.9 → 689.5 (y ₇ ⁺)	30/24
ApoC2	TYPISMDEK	542.7 → 410.7 (y ₇ ²⁺)	30/15
ApoC2 (IS)	TYPISMDE-[¹³ C ₆ . ¹⁵ N ₂]K	546.7 → 414.7 (y ₇ ²⁺)	30/15
ApoC3	GWMDNHFR	532.1 → 819.8 (y ₆ ⁺)	30/25
ApoC3 (IS)	GWMDNHF-[¹³ C ₆ . ¹⁵ N ₄]R	537.1 → 829.8 (y ₆ ⁺)	30/25
ApoE	TANLGAGAAQPLR	620.8 → 840.5 (y ₉ ⁺)	30/25
ApoE (IS)	TANLGAGAAQPL-[¹³ C ₆ . ¹⁵ N ₄]R	625.8 → 850.5 (y ₉ ⁺)	30/25

IS. *internal standard*.

8. Analyses transcriptomiques

8.1. Extraction des ARN et RT-qPCR

Après l'extraction des ARN avec le TRIzol (Invitrogen) ou le Nucleozol (Macherey-Nagel), un traitement à la DNase (PROMEGA) est effectué sur 1 µg d'ARN. La rétrotranscription (RT) est ensuite réalisée avec le kit « *High capacity cDNA – Reverse transcription kit* » (Applied Biosystems). La qPCR est réalisée avec le kit «Brillant II SYBR Green – qPCR Master Mix» (Agilent technologies) ou le kit «Takyon Low ROX SYBR 2X Mastermix Blue » (Eurogenetec) en présence des oligonucléotides spécifiques de chaque gène (voir **Tableau 5 et 6**).

Tableau 5 : Séquence des oligonucléotides murins pour chaque gène.

Gène	Sens	Anti-sens
<i>Abcg5</i>	TGGCCCTGCTCAGCATCTCTG	GGATTTTTAAAGGAATGGGCATCTCTTG
<i>Abcg8</i>	CCGTCGTGACATTTCCAATGA	GGCTCCGACCCATGAATG
<i>Apob</i>	GTGGCTTCTGTCACTGCTAAAG	GTCTGATTTCCCCTCAATGG
<i>ApoF</i>	TGGCCGACTGTATGGGTG	CTCTCCGTGTGAAGTGGCAT
<i>Apon</i>	ACCTCTTGACACGGTGCTC	GTTTCCGCGCTGTCTTTTCC
<i>Ccr2</i>	ATTCTCCACACCCTGTTTCG	CATGGCCTGGTCTAAGTGCT
Cyclophilin A	GCATACGGGTCCTGGCATCTTGTC	ATGGTGATCTTCTTGCTGGTCTTGC
<i>Cyp27a1</i>	TTGCTCAGTACTCAGGAGACCA	GCTCTTTGAAAGGTGGTACAGG
<i>Cyp7a1</i>	CTGTCATACCACAAAGTCTTATGTCA	ATGCTTCTGTGTCCAAATGCC
<i>Cyp8b1</i>	GACGCTGTGGTGTACAGTGC	CTGCGGTGCCTGAGCAGCAAG
<i>F4/80</i>	TTTCCTCGCTGCTTTTC	CCCCGTCTCTGTATTCAACC
<i>Fxr</i>	CCTGAGAACCCACAGCATTT	GTGTCCATCACTGCACATCC
<i>Gzma</i>	GTGCTGGCGCTTTGATTGAA	TGCTACTCGGCATCTGGTTC
<i>Gzmb</i>	CTTTGAGGGCCAGTTGGAC	TAGTCGGCTGGGGAAGGGTA
<i>Idol</i>	ATGCTGTGCTATGTGACGAGG	TCGATGATCCCTAGACGCCTG
<i>Ldlr</i>	CAGGCAGCAGGAACGAGTTC	GGAGTCAGGAATGCATCGGC
<i>Lrp1</i>	GCTGCTGCTGCTGCCGCTGC	CCGTTGCAGAGACGAGACATG
<i>Mcp1</i>	GCCAACTCTCACTGAAGCC	GCTGGTGAATGAGTAGCAGC
<i>Mttp</i>	TATGACCGTTTCTCCAAGAG	TCAATCACCACCTGACTACC
<i>Pcsk9</i>	AGGTGGAGGTGTATCTCTTAGATACCA	CGCTGTTGAAGTCGGTGATG
<i>Lpk</i>	GAGTCTTCCCCTTGCTCTACC	GTCACCACAATCACCAGATCAC
<i>Prf1</i>	TTCTCCCTGGGGATCTGCAA	TTCTCCCTGGGGATCTGCAA
<i>Sr-b1</i>	GGGCTCGATATTGATGGAGA	GGAAGCATGTCTGGGAGGTA
<i>Srebp2</i>	GTGGAGCAGTCTCAACGTCA	CCGGATGCATGGTAGGTCTC
<i>Stat2</i>	AGAAGTCTGCATTGGAGCC	TTCAGTAGCTGCCGAAGGTG
<i>Syndecan-1</i>	GGAAGTGCTGGGAGGTGTCA	ACCGCCATTGGCTTGTGTTGG
TFIIB	ACCAGCCGTTTGGATGCTC	CCCACATCAATAACCCGGTC
36B4	CATGCTCAACATCTCCCCCTTCTCC	GGGAAGGTGTAATCCGTCTCCACAG

Tableau 6 : Séquence des oligonucléotides humains pour chaque gène.

Gène	Sens	Anti-sens
APOF	ACCCCTTGTCTGCCAATTT	CCAGGGCATTCTTAGAGCC
BSEP	GGGCCATTGTACGAGATCCTAA	TGCACCGTCTTTTCACTTTCTG
CPT1	TATCGTGGTGGTGGGCGTGATG	TCTGGCTGGACATGCAGTTGGC
Cyclophilin A	GCATACGGGTCCTGGCATCTTGTC	ATGGTGATCTTCTTGCTGGTCTTGC
CXCL10	AGCCCCACGTTTTCTGAGAC	TGCATCGATTTTGTCCCCT
LDLR	CAGATATCATCAACGAAGC	CCTCTCACACCAGTTCACTCC
LPK	CTTTACCGTGAACCTCCAGAAG	GTCACCACAATCACCAGGTCT
LRP1	TGCAGCAAGGCTGACGGCTC	GAACCTACGCCCTCGCAGGC
PCSK9	ACGTGGCTGGCATTGCA	AAGTGGATCAGTCTCTGCCTCAA

PDK4	GATGAACCAGCACATTCTTA	GCTACCACATCACAGTTAGG
SREBP1c	CAAGACAGTGACTTCCCTGGCC	AGGCTTCAAGAGAGGAGCTC
SREBP2	TGGCTTCTCTCCCTACTCCA	GAGAGGCACAGGAAGGTGAG
TFIIB	ACCAGCCGTTTGGATGCTC	CCCACATCAATAACCCGGTC
36B4	CATGCTCAACATCTCCCCCTTCTCC	GGGAAGGTGTAATCCGTCTCCACAG

8.2. Puces à ARN

L'ARN est extrait des foies de souris Ad-GFP et Ad-hApoF (6 souris par condition), 4 jours après l'infection par les adénovirus avec le kit Nucleozol puis purifié sur des colonnes (Machery Nagel). La quantité et la qualité de l'ARN ont été évaluées à l'aide du bioanalyseur Agilent 2100 (Agilent Biotechnologies). L'analyse du transcriptome a été réalisée avec les matrices Affymetrix GeneChip MoGene 2.0 ST. Les puces à ARN ont été scannées avec le GeneChip Scanner 3000-7G (Affymetrix) en utilisant la *Command Console* v4.1.2. Les contrôles de qualité ont été effectués à l'aide de la console d'expression Affymetrix.

Les données des puces à ARN ont été normalisées par la méthode de la moyenne multiple robuste (*robust multichip average*, RMA) en utilisant oligo/Bioconductor. Pour identifier les gènes exprimés de manière différentielle, les ensembles de sondes ont d'abord été réduits à des symboles sélectionnant la sonde la plus exprimée dans le cas où plusieurs sondes correspondaient à un gène donné. La liste des gènes a ensuite été filtrée par niveau d'expression afin de sélectionner les 12 000 transcrits les plus représentés. L'expression différentielle des gènes a été calculée par limma en utilisant Phantasus²³⁰. L'analyse d'enrichissement des ensembles de gènes (*gene set enrichment analysis*, GSEA) a été réalisée dans EnrichR (<http://amp.pharm.mssm.edu/Enrichr/>).

9. Analyses biochimiques

Les activités plasmatiques de l'aspartate aminotransférase (ASAT) et de l'ALAT ont été déterminées par des tests colorimétriques (Thermo Fischer Scientific) sur plasmas obtenus après prélèvement au sinus rétro-orbital. L'ApoB et l'ApoA1 des souris sous régime HFHS+chol sont quantifiées par néphélométrie utilisant des anticorps «maison» à l'automate Konelab²³¹ (Thermo Fischer Scientific).

10. Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide des logiciels Prism (GraphPad, San Diego, CA) et R (R-project.org). Les valeurs aberrantes sont exclues après un test de Grubbs. Les différences statistiques entre deux groupes sont évaluées par un test t de Student non apparié. Les différences statistiques entre 3 groupes ou plus sont évaluées par

une analyse de variance (ANOVA) à une ou deux voies, suivie du test post hoc de Fisher, comme indiqué dans les légendes des figures. La signification statistique a été considérée comme atteinte lorsque les valeurs p étaient inférieures à 0,05, indiqué par *. Tous les graphiques indiquent les moyennes \pm l'erreur standard de la moyenne (SEM, *standard error of the mean*).

Résultats

Partie 1 : Etude de la modulation de l'expression de l'ApoF *in vivo* sur le métabolisme des lipides

1. L'expression hépatique de l'APOF corrèle avec la stéatose et la dyslipidémie chez l'Homme

Le foie est un acteur majeur déterminant la concentration plasmatique de TG via la sécrétion de VLDL. Le taux de sécrétion hépatique de TG est, de plus, étroitement associé au contenu intra-hépatique en TG¹¹⁶. Afin d'identifier de nouvelles voies de régulation hépatique qui pourraient expliquer ce lien, nous avons réalisé une analyse transcriptomique sur des biopsies de foie provenant d'une cohorte de patients obèses afin d'identifier les gènes dont l'expression hépatique est corrélée à la fois avec le niveau de stéatose hépatique et aux concentrations de TG circulantes. Dans cette analyse, nous avons trouvé plusieurs gènes déjà connus (par exemple *FABP4*²³², *PLIN1*²³³, *ACLY*²³⁴) parmi les 100 premiers transcrits positivement corrélés avec la stéatose hépatique (**Tableau 7**). Parmi les transcrits inversement corrélés à la stéatose, l'*APOF* est le 4^{ème} transcrit dont la corrélation est la plus forte. De plus, nous avons montré que l'*APOF* est le transcrit le plus inversement corrélé aux concentrations plasmatiques de TG (**Tableau 8**).

Tableau 7 : Listes des 20 premiers transcrits les plus positivement (gauche) et négativement (droite) corrélés à la stéatose chez des patients obèses.

Gène	ρ	p-value
FAT1	0,49919894	4,60E-36
PRAMEF10	0,44993536	8,12E-29
KRT8	0,44284121	7,23E-28
SULF2	0,43514974	7,31E-27
LPL	0,42397408	1,90E-25
TMEM19	0,41217892	5,20E-24
KRT18	0,41002629	9,37E-24
MACROH2A2	0,40720635	2,02E-23
TMEM154	0,40202962	8,07E-23
ZMAT3	0,40089786	1,09E-22
ME1	0,40027715	1,28E-22
FCAMR	0,39988479	1,42E-22
ANKRD18A	0,3991184	1,74E-22
GNA12	0,39765887	2,56E-22
FABP4	0,39665144	3,33E-22
SATB2	0,39330543	7,93E-22
SERPINB8	0,39251905	9,71E-22
MIR622	0,39155819	1,24E-21

Gène	ρ	p-value
DNAJC12	-0,47051028	1,06E-31
NUDT13	-0,45828048	5,80E-30
VIL1	-0,42879049	4,74E-26
APOF	-0,42603517	1,05E-25
SLC16A10	-0,40361086	5,30E-23
P4HA1	-0,39434606	6,06E-22
CENPV	-0,38930649	2,21E-21
PDIA5	-0,38894199	2,42E-21
TNIK	-0,38471784	7,03E-21
PELI2	-0,37699472	4,74E-20
RGS5	-0,37414335	9,47E-20
UHRF2	-0,37406148	9,66E-20
RBMS1	-0,37198555	1,59E-19
MIR4785	-0,37198555	1,59E-19
CD82	-0,3717464	1,69E-19
TCF7L1	-0,36803555	4,07E-19
PACSIN3	-0,36685291	5,38E-19
PTPRD	-0,36550753	7,39E-19

CDKN1A	0,38613526	4,93E-21
TP53I3	0,38503614	6,49E-21

ECE1	-0,36435832	9,66E-19
RAB30-DT	-0,35787398	4,31E-18

Tableau 8 : Listes des 20 premiers transcrits les plus positivement (gauche) et négativement (droite) corrélés aux concentrations plasmatiques de TG chez des patients obèses.

Gène	ρ	p-value
FAT1	0,37855255	3,79E-20
ZMAT3	0,3403236	2,37E-16
SATB2	0,32382002	7,21E-15
WDPCP	0,30976575	1,13E-13
DEFB1	0,30346361	3,70E-13
MAMDC4	0,29549347	1,59E-12
TMEM19	0,29218936	2,88E-12
SQLE	0,28971209	4,46E-12
ANKRD18A	0,28400422	1,21E-11
ME1	0,27911343	2,78E-11
ANKRD18B	0,27812276	3,29E-11
HMGCS1	0,27574651	4,89E-11
PDE11A	0,27192857	9,21E-11
PTPN11	0,27086603	1,10E-10
DDB2	0,26942988	1,38E-10
ACLY	0,26931986	1,41E-10
TARBP1	0,26573327	2,51E-10
FASN	0,26257312	4,15E-10
MEAF6	0,26252706	4,18E-10
NSDHL	0,2597374	6,48E-10

Gène	ρ	p-value
APOF	-0,31506941	4,07E-14
DNAJC12	-0,31359848	5,41E-14
P4HA1	-0,29836595	9,45E-13
SOCS2	-0,29714255	1,18E-12
SERPINA1	-0,28998656	4,25E-12
TENM3	-0,27616741	4,56E-11
C9	-0,27564538	4,98E-11
DIPK2A	-0,27329278	7,35E-11
PC	-0,27157912	9,75E-11
CD82	-0,26416208	3,23E-10
SERPINA3	-0,26197998	4,56E-10
NUDT13	-0,26147946	4,93E-10
SOCS2-AS1	-0,25560057	1,23E-09
IGF1	-0,25517029	1,31E-09
PTPRD	-0,25126992	2,37E-09
C8A	-0,24554214	5,56E-09
MYOM1	-0,24496304	6,05E-09
TIMD4	-0,24326961	7,74E-09
PHF8	-0,24071206	1,12E-08
IGFALS	-0,23971638	1,29E-08

Sachant que l'ApoF est spécifiquement et exclusivement exprimée dans le foie¹⁸⁷, nous avons cherché à étudier si son expression est corrélée aux paramètres cliniques de cette cohorte. L'expression hépatique de l'*APOF* diminue avec l'augmentation du grade de stéatose. La diminution observée est d'environ 40 % entre le grade 0 et le grade 3 (**Figure 23A**). L'expression de l'*APOF* est non seulement inversement corrélée aux TG plasmatiques (**Figure 23B**), mais également aux concentrations de non-HDL-C (**Figure 23D**). A l'inverse, l'expression de l'*APOF* est corrélée positivement aux concentrations de HDL-C (**Figure 23C**). Plus précisément, une diminution de 10 % de l'expression de l'*APOF* est associée à une augmentation de 0,1 mmol/L de la concentration plasmatique de TG (**Figure 23B**). Collectivement, ces résultats montrent qu'une faible expression hépatique de l'*APOF* est associée à une augmentation de la stéatose hépatique et à la présence d'un profil lipoprotéique athérogène caractérisé par des concentrations plasmatiques élevées de TG, de non-HDL-C et des concentrations réduites de HDL-C.

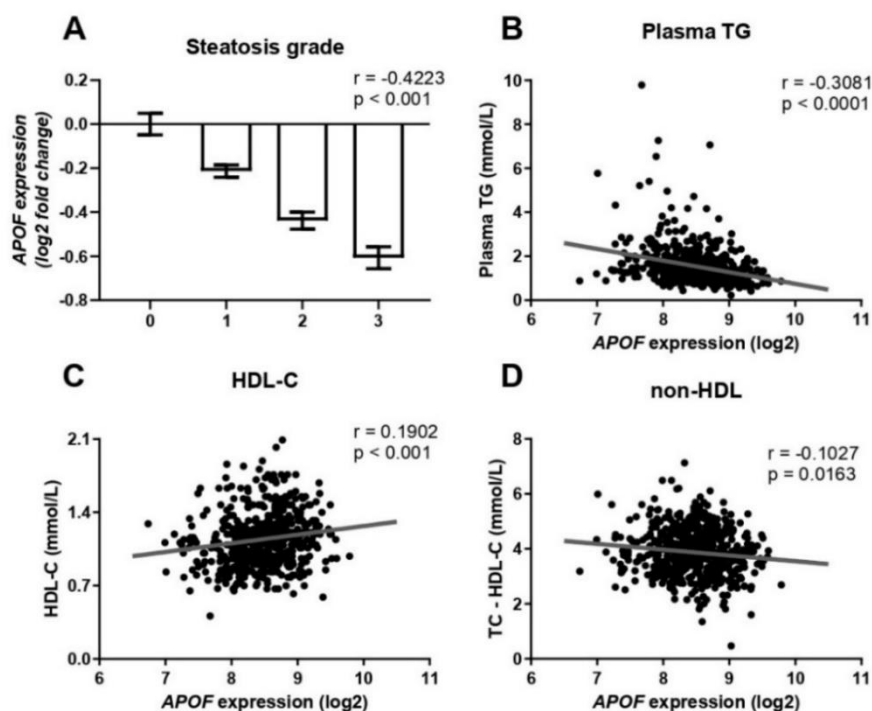


Figure 23 : L'expression de l'APOF hépatique est négativement corrélée avec la stéatose et la dyslipidémie dans une cohorte de patients obèses. (A) Expression normalisée de l'ARNm de l'APOF hépatique selon le grade de stéatose chez les patients obèses. Relation entre les concentrations plasmatiques de TG (B), HDL-C (C) et non HDL-C (D) et l'expression de l'APOF hépatique dans une cohorte de patients obèses ($n=551$; 128 hommes et 423 femmes). r , coefficient de corrélation de Spearman. Les données de (A) sont présentées sous forme de changement log2 par rapport au grade $0 \pm SEM$.

2. Validation du modèle de surexpression de l'APOF

Nos précédents résultats obtenus chez l'homme suggèrent que l'ApoF joue un rôle dans le développement de la stéatose hépatique et la dyslipidémie. Toutefois, son rôle dans le métabolisme des lipoprotéines n'est pas complètement élucidé. Notre 1^{er} objectif est donc d'identifier comment la modification de l'expression de l'ApoF hépatique affecte le métabolisme des lipoprotéines.

Pour étudier ceci, nous avons choisis d'utiliser des vecteurs adénoviraux pour augmenter l'expression de l'APOF de façon transitoire chez des souris C57BL/6J mâles (WT). Lorsqu'ils sont injectés en intraveineuse, ces adénovirus ciblent principalement le foie mais peuvent aussi se retrouver, à des niveaux bien inférieurs, dans d'autres tissus²³⁵. L'injection d'adénovirus à forte concentration peut également engendrer un état inflammatoire et une souffrance hépatique. Dans un premier temps, nous avons donc vérifié que les doses utilisées pour l'injection des adénovirus Ad-GFP et Ad-hApoF n'induisent pas une souffrance hépatique en mesurant la concentration plasmatique d'ALAT. Quatre jours après l'injection, la concentration plasmatique d'ALAT est plus élevée après l'injection de l'Ad-GFP que de l'Ad-hApoF (**Figure 24A**). Toutefois, la concentration d'ALAT reste peu élevée dans les deux

groupes avec une moyenne de 180 U/L pour le groupe Ad-GFP contre 29 U/L pour le groupe Ad-hApoF. Dans un second temps, nous avons cherché à vérifier la spécificité de notre adénovirus en quantifiant l'expression de l'*APOF* dans différents tissus. Quatre jours après l'injection, l'expression de l'*APOF* mesurée dans le foie est 200 à 1500 fois supérieure par rapport à celle mesurée dans le muscle, le cœur, le tissu adipeux gonadique, le poumon et la rate (**Figure 24B**). Concernant le foie, nous mesurons un enrichissement de l'ARNm de l'*APOF* (**Figure 24C**) s'accompagnant de l'apparition de la protéine ApoF humaine dans le plasma des souris injectées avec l'Ad-hApoF par rapport aux souris contrôles Ad-GFP (**Figure 24E**). L'expression de l'*ApoF* endogène hépatique est également légèrement augmentée (**Figure 24D**). Nous pouvons donc conclure que la surexpression de l'*APOF* par les injections des adénovirus Ad-GFP et Ad-hApoF sont spécifiques du foie et induisent peu de souffrance hépatique aux doses testées.

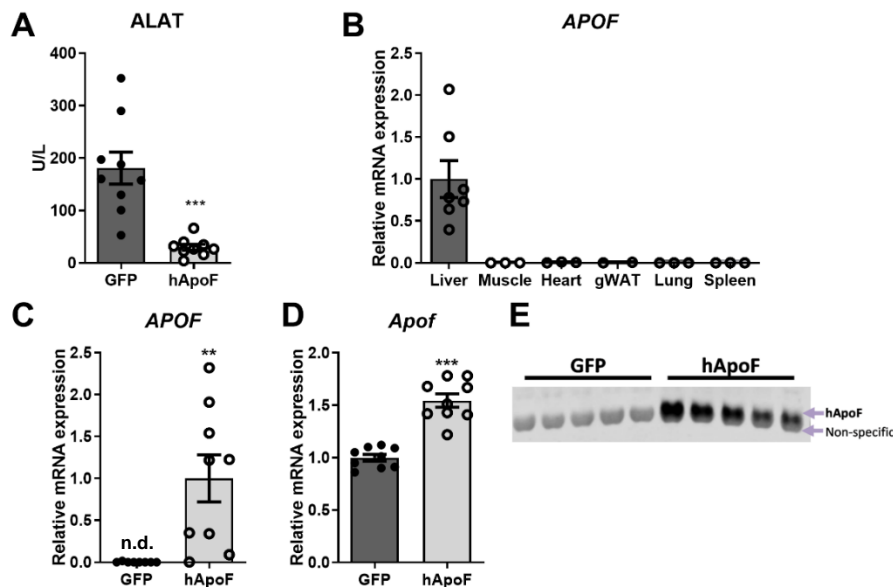


Figure 24 : Validation du modèle de surexpression de l'*APOF* par injection de vecteurs adénoviraux. (A) Concentration plasmatique d'ALAT chez des souris Ad-GFP ou Ad-hApoF après un jeûne de 5 heures (pool de 3 expériences indépendantes, n=7-8 par groupe par expérience). (B) Comparaison de l'ARNm de l'*APOF* hépatique dans différents tissus chez les souris Ad-hApoF (n=3-6 par tissus). ARNm de l'*APOF* humaine (C) et endogène (D) dans le foie chez les souris Ad-GFP ou Ad-hApoF (n=8-9 par groupe). (E) Western blot de l'*ApoF* humaine dans le plasma chez les souris Ad-GFP ou Ad-hApoF (n=5 par groupe). **p<0,01, ***p<0,001 par rapport au contrôle par t-test. Toutes les données sont présentées sous forme de moyennes ± SEM.

3. La surexpression de l'*APOF* chez la souris est associée à une réduction des concentrations plasmatiques de TG

Des expériences de surexpression de l'*ApoF* par injection d'AAV, rendant la surexpression stable au cours du temps, a permis de démontrer un rôle de l'*ApoF* dans le métabolisme du cholestérol¹⁸⁵. Dans un premier temps, nous avons cherché à déterminer si la surexpression aiguë de l'*APOF* modulait également le métabolisme du cholestérol. De manière surprenante, la surexpression de l'*APOF* ne module ni les concentrations plasmatiques en

TC (**Figure 25A**) ni la distribution du cholestérol dans les différentes lipoprotéines séparées par FPLC (**Figure 25C**). Les concentrations plasmatiques de l'ApoA1 et de l'ApoA2, deux apolipoprotéines majeures des HDL, sont également comparables entre les souris Ad-GFP ou Ad-hApoF (**Figure 25E et F**) et confirme l'absence de modulation du cholestérol en présence de l'Ad-hApoF. En revanche, la concentration en TG est significativement diminuée de 30% chez les souris surexprimant l'APOF (**Figure 25B**). Cette distribution correspond majoritairement à la réduction des TG contenus dans les VLDL (~50%) puis des LDL (**Figure 25D**). Une réduction de 15% de l'ApoB ($p < 0,05$), composant majeur des lipoprotéines de basse densité (VLDL, IDL, LDL), est également mesurée chez les souris Ad-hApoF (**Figure 25G**). La surexpression aiguë de l'APOF chez la souris est donc associée à une réduction des concentrations plasmatiques de VLDL-TG mais ne semble pas modifier les concentrations de cholestérol.

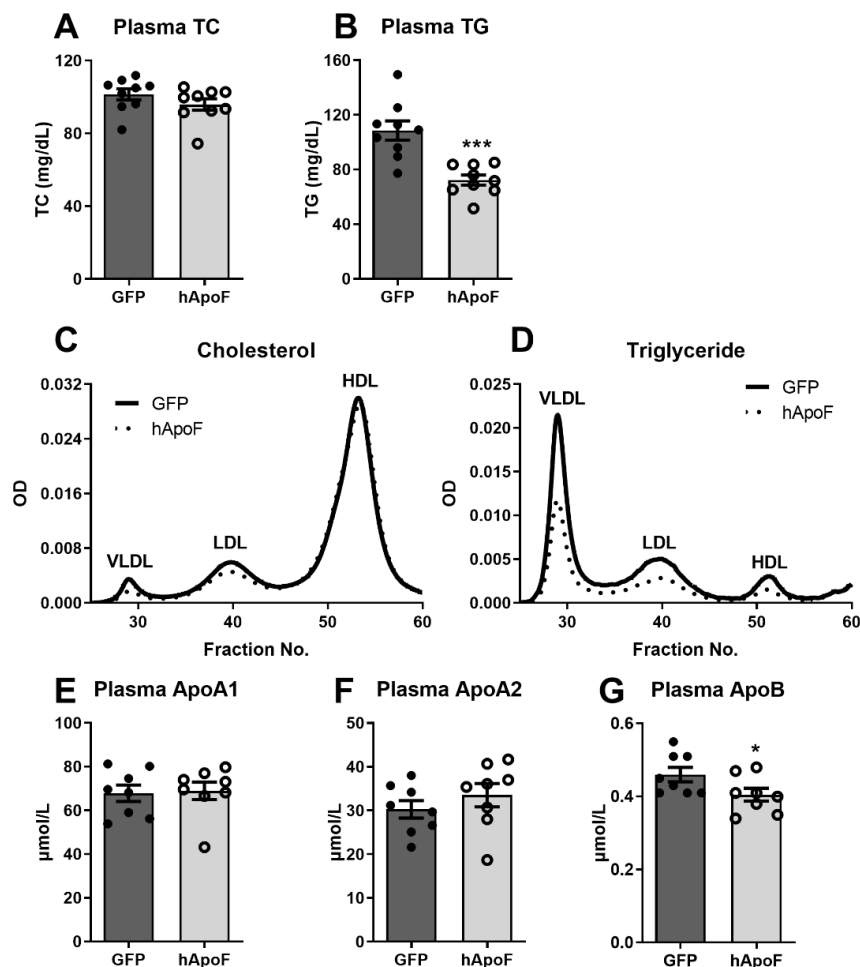


Figure 25 : La surexpression de l'APOF est associée à une diminution des concentrations plasmatiques de TG. Concentration plasmatique de TC (A) et de TG (B) chez des souris Ad-GFP ou Ad-hApoF après un jeûne de 5 heures ($n=8-9$ par groupe). Mesure du cholestérol (C) et des TG (D) plasmatiques dans les différentes fractions lipoprotéiques après séparation par FPLC chez des souris Ad-GFP ou Ad-hApoF après un jeûne de 5 heures ($n= 1$ pool de 6 souris par groupe). Concentration plasmatique de l'ApoA1 (E), l'ApoA2 (F) et l'ApoB (G) chez des souris Ad-GFP ou Ad-hApoF après un jeûne de 5 heures ($n=8$ par groupe). * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ par rapport au contrôle par *t*-test. Toutes les données sont présentées sous forme de moyennes \pm SEM.

4. La surexpression de l'*APOF* favorise la sécrétion des TG par le foie

En condition de jeûne, les concentrations de TG sont déterminées par l'équilibre entre la production hépatique de VLDL-TG et la clairance des TG par la lipolyse intravasculaire ou la capture des lipoprotéines par des récepteurs. Pour déterminer comment la surexpression de l'*APOF* affecte cet équilibre, nous avons d'abord mesuré la production hépatique de VLDL-TG chez des souris Ad-hApoF et Ad-GFP. Après un jeûne de 5 heures, les souris ont reçu une injection de P407, qui bloque la lipolyse intravasculaire et entraîne l'accumulation dans la circulation des VLDL sécrétées par le foie²³⁶. 120 et 180 min après l'injection de P407, les concentrations de TG plasmatiques sont plus élevées chez les souris Ad-hApoF que chez les souris contrôles Ad-GFP (**Figure 26A**), suggérant une augmentation de la production hépatique de VLDL-TG. Toutefois, ces résultats sont surprenants puisque chez les souris surexprimants l'*APOF*, nous observons une diminution de la concentration plasmatique en TG (**Figure 25B et Figure 26A, 0 mins**) ce qui laisse penser que le catabolisme des lipoprotéines de basse densité est lui aussi augmenté. Nous avons donc calculé la production de TG hépatiques et le FCR (indicateur de la production et du catabolisme des VLDL-TG). Chez les souris Ad-hApoF, la production et le catabolisme des lipoprotéines sont augmentés (**Figure 26B et C**). La mesure des lipides hépatiques confirme également ce résultat. En effet, 180 min après l'injection de P407, les concentrations des TG hépatiques mais aussi le contenu hépatique en cholestérol sont diminués dans les foies des souris Ad-hApoF vis-à-vis des souris contrôles Ad-GFP (**Figure 26D et E**). De plus, l'expression de l'ARNm de l'*Apob*, mais pas celle de *Mttp*, est augmentée dans les foies des souris Ad-hApoF suggérant, à nouveau, une augmentation de la production de VLDL (**Figure 26F**).

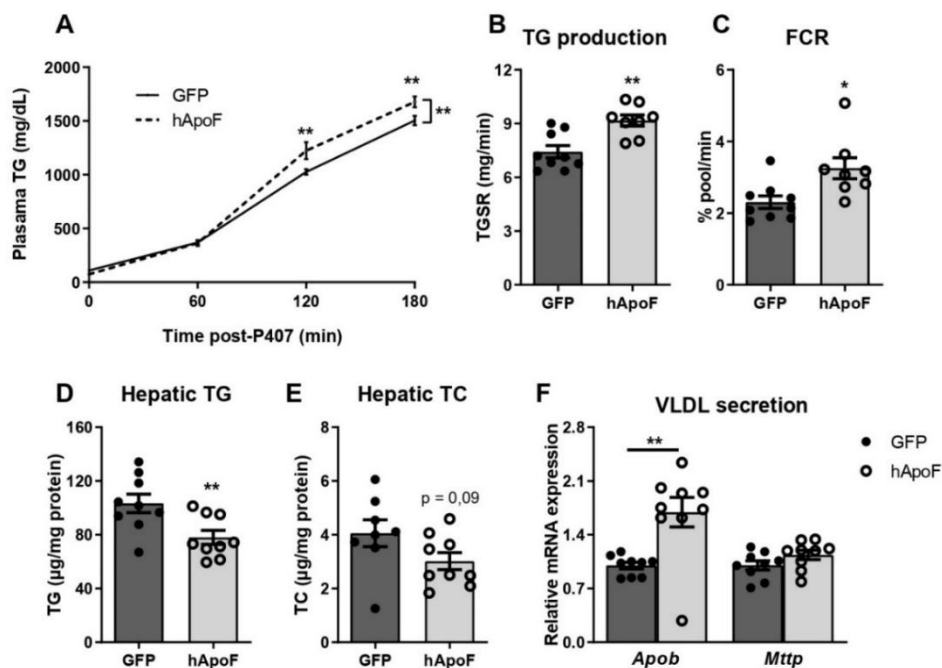


Figure 26 : La surexpression de l'APOF favorise la sécrétion des TG par le foie. TG plasmatiques (A) et calcul de la production de TG (B) et du FCR (C) après l'injection i.p. de P407 (1g/kg de poids corporel) (n=8-9 par groupe). Concentration hépatique de TG (D) et de TC (E) chez des souris Ad-GFP ou Ad-hApoF 180 min après l'injection de P407 (n=8-9 par groupe). (F) ARNm de ApoB et Mttp dans le foie chez les souris Ad-GFP ou Ad-hApoF (n=9 par groupe). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ par rapport au contrôle par t-test ou ANOVA à deux voies pour (A). Les comparaisons multiples ont été évaluées par le test post-hoc LSD de Fisher pour (A). Toutes les données sont présentées sous forme de moyennes \pm SEM.

5. La réduction aiguë de l'expression de l'ApoF est associée à une diminution de la sécrétion de TG par le foie

Pour vérifier si des effets similaires pourraient être observés avec de faibles niveaux d'ApoF, nous avons utilisé un adénovirus codant pour un shARN dirigé contre l'ApoF afin de diminuer de façon aiguë l'expression de l'ApoF endogène (Ad-shApoF) chez des souris mâles contrôles (WT) en fond C57Bl6/J. Quatre jours après l'injection, nous obtenons une diminution significative de 30 % de l'expression de l'ARNm de l'ApoF dans le foie (**Figure 27A**). Les concentrations plasmatiques d'ASAT et d'ALAT bien que faibles, ont tendance à être plus élevées après l'injection de l'Ad-shApoF que de l'Ad-shLacZ (**Figure 27B**). A nouveau, nous n'observons pas de changement dans les concentrations plasmatiques en TC ni du contenu en cholestérol dans les différentes fractions lipoprotéiques (**Figure 27C et D**). Dans cette expérience, nous n'observons pas non plus de différence de concentration en TG bien qu'une tendance à l'augmentation d'environ 30% des VLDL-TG soit observée chez les souris Ad-shApoF (**Figure 27E et F**).

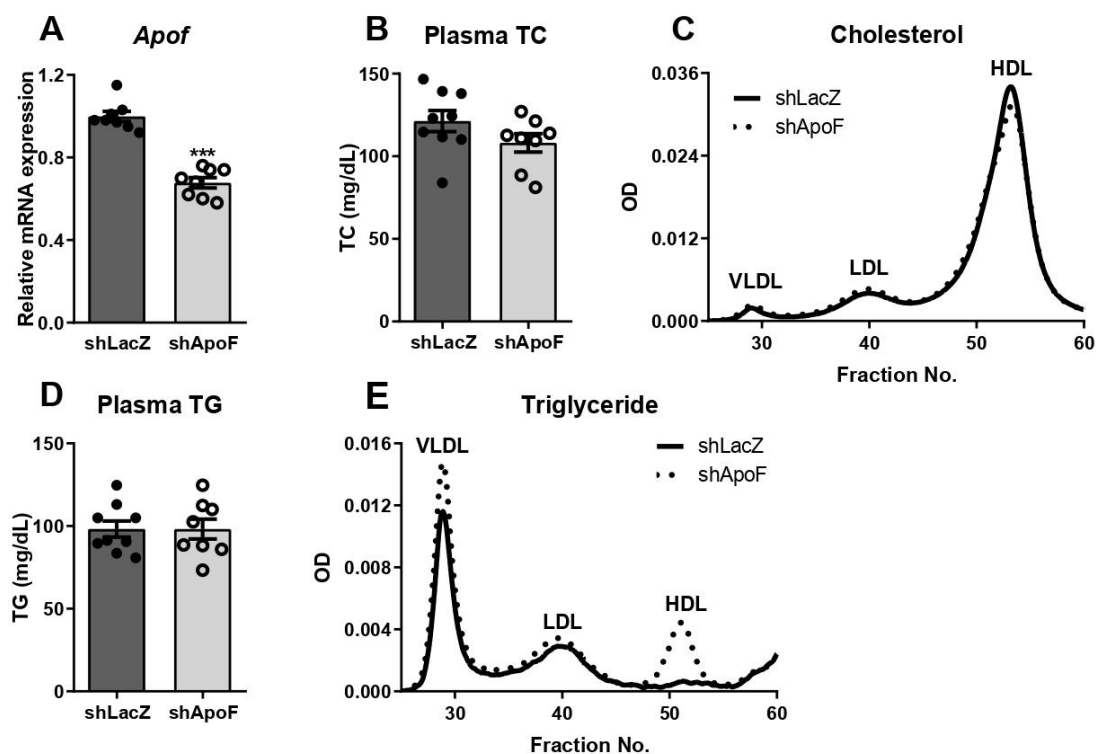


Figure 27 : La diminution de l'expression de l'ApoF augmente les concentrations plasmatiques de VLDL-TG. (A) ARNm de l'ApoF hépatique chez les souris Ad-shLacZ ou Ad-shApoF (n=8 par groupe). (B) Concentration

plasmatique d'ASAT et ALAT (B), de TC (C) et de TG (E) chez des souris Ad-shLacZ ou Ad-shApoF après un jeûne de 5 heures (n=8-9 par groupe). Mesure du cholestérol (D) et des TG (F) plasmatiques dans les différentes fractions lipoprotéiques après séparation par FPLC chez des souris Ad-shLacZ ou Ad-shApoF après un jeûne de 5 heures (n= 1 pool de 6 souris par groupe). ***p<0,001 par rapport au contrôle par t-test Toutes les données sont présentées sous forme de moyennes ± SEM.

Malgré une faible réduction de l'expression de l'*ApoF*, nous avons observé une diminution significative de la production hépatique de VLDL-TG chez les souris Ad-shApoF (**Figure 28A et B**), et une tendance à la diminution (de 17%, p=0,15) du FCR (**Figure 28C**), suggérant une réduction du catabolisme des TG plasmatiques chez les souris injectées avec l'Ad-shApoF. Toutefois, nous n'avons pas observé de changement des concentrations hépatiques en TG et en cholestérol (**Figure 28D et E**) bien que l'expression de l'*ApoB* soit légèrement diminuée chez les souris Ad-shApoF (**Figure 28F**). L'ensemble des résultats obtenus suggère donc que la réduction de l'expression de l'*ApoF* diminue la sécrétion et la clairance des VLDL-TG.

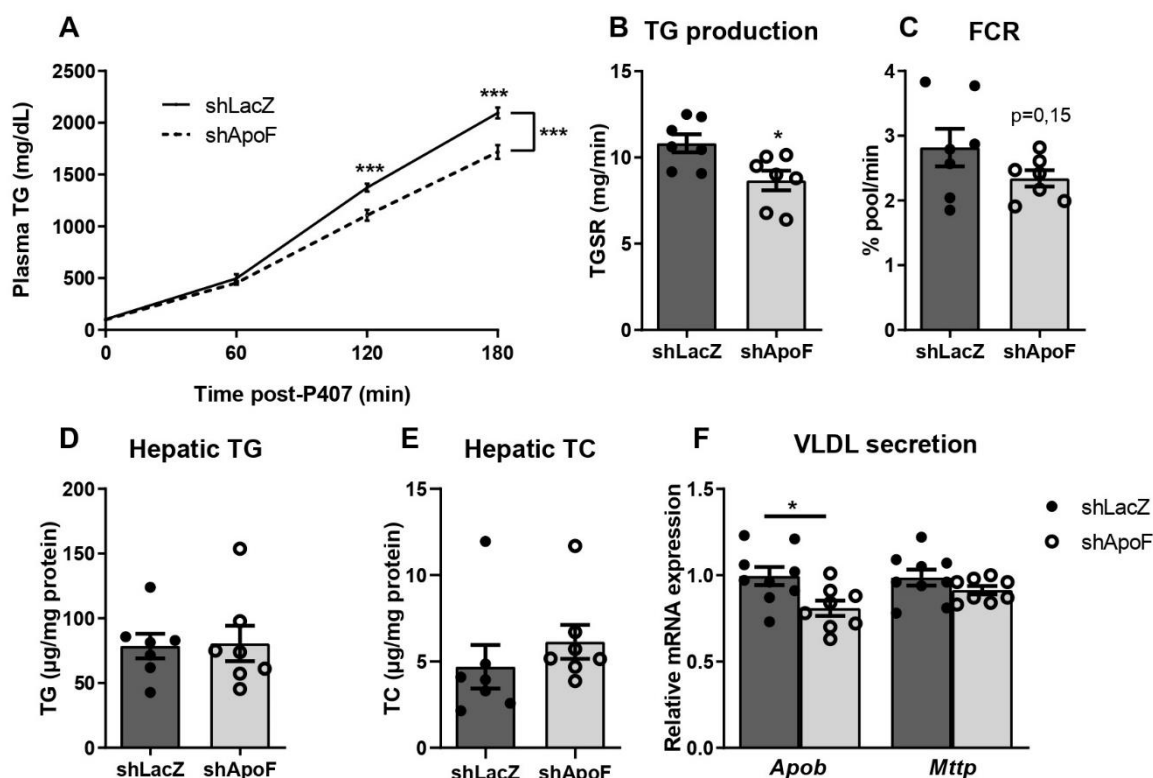


Figure 28 : La réduction d'expression de l'*ApoF* est associée à une diminution de la sécrétion des VLDL-TG. TG plasmatiques (A) et calcul de la production de TG (B) et du FCR (C) après l'injection i.p. de P407 (1g/kg de poids corporel) (n=7 par groupe). Concentration hépatique de TG (D) et de TC (E) chez des souris Ad-shLacZ ou Ad-shApoF 180 min après l'injection de P407 (n=7 par groupe). (F) ARNm de *ApoB* et *Mttp* dans le foie chez les souris Ad-shLacZ ou Ad-shApoF (n=9 par groupe). *p<0,05, ***p<0,001 par rapport au contrôle par t-test ou ANOVA à deux voies pour (A). Les comparaisons multiples ont été évaluées par le test post-hoc LSD de Fisher pour (A). Toutes les données sont présentées sous forme de moyennes ± SEM.

Toutefois, les effets liés à la réduction de l'expression de l'*ApoF* sur les concentrations plasmatiques de lipides sont peu marqués, probablement à cause de la faible diminution de

l'expression de l'*ApoF* (30%, **Figure 27A**). Pour tenter de potentialiser ces effets, nous avons choisi d'étudier l'impact de la délétion totale de l'*ApoF* sur les lipides plasmatiques. Grâce à une collaboration avec le laboratoire du Dr. Bart Van de Sluis (Groningen), nous avons développé un modèle de souris déficientes pour l'ApoF (ApoF-KO) par la technique CRISPR-Cas9. Un modèle ApoF-KO avait déjà été mis au point par une technique de recombinaison homologue. Toutefois, dans ce modèle de souris, l'invalidation génique de l'ApoF n'est pas spécifique²⁰⁵. En effet, l'ApoN et Stat2, deux gènes encadrant le locus de l'ApoF, sont également délétés. Dans un premier temps, nous avons donc vérifié la spécificité de notre modèle ApoF-KO. Ainsi, nous observons une extinction totale de l'expression hépatique de l'*ApoF* chez les souris ApoF-KO tandis que les expressions de l'*Apon* et de *Stat2* restent inchangées vis-à-vis des souris contrôles (**Figure 29A**). Comme observé avec l'Ad-shApoF (**Figure 27**), les concentrations plasmatiques en TC et le contenu en cholestérol dans les différentes fractions lipoprotéiques ne sont pas différents entre les souris contrôles et les souris ApoF-KO (**Figure 29B et C**). Comme pour le modèle shApoF, les concentrations plasmatiques de TG ne semblent pas modifiées entre les deux groupes (**Figure 29D**) bien que l'on observe une augmentation de 30% des TG dans les VLDL (**Figure 29E et F**).

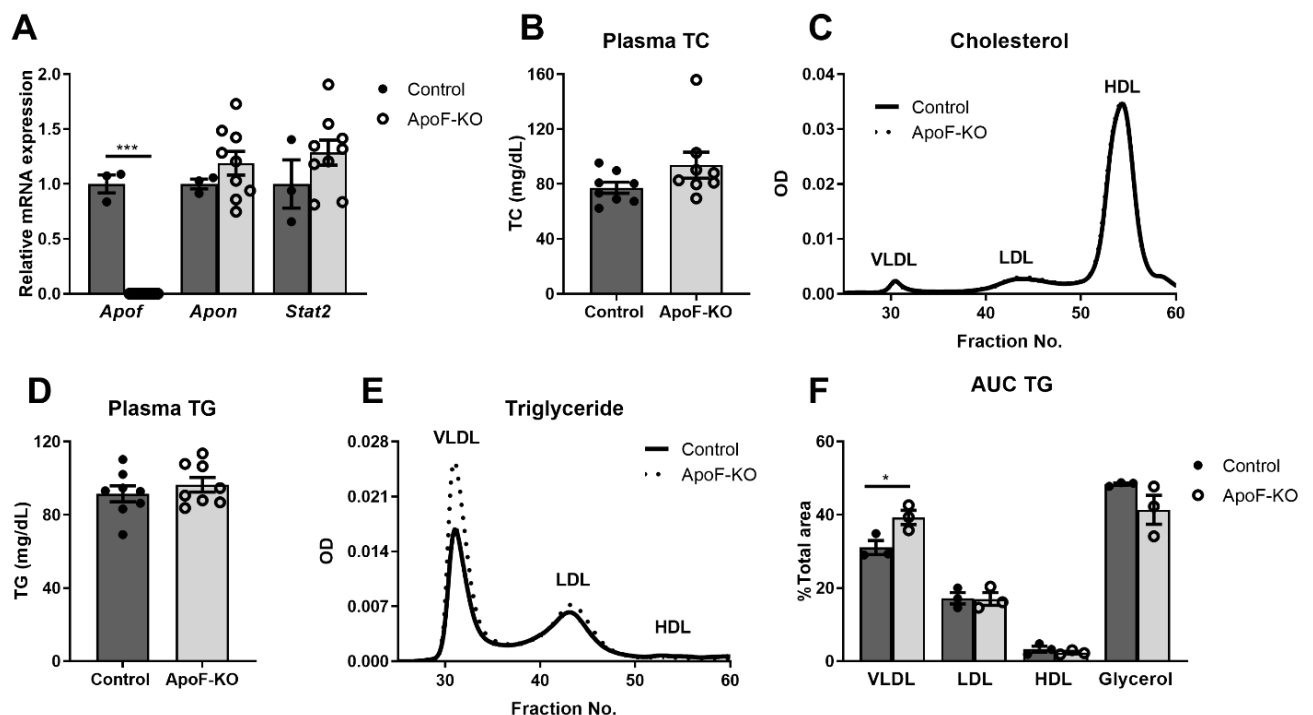


Figure 29 : La déficience totale de l'*ApoF* est associée à une légère augmentation des concentrations plasmatiques de VLDL-TG. (A) ARNm de l'*ApoF*, de l'*Apon* et de *Stat2* dans le foie chez les souris contrôles ou ApoF-KO après un jeûne de 5 heures (n=3-9 par groupe). Concentration plasmatique du TC (B) et des TG (D) chez des souris contrôles ou ApoF-KO après un jeûne de 5 heures (n=8 par groupe). Mesure du cholestérol (C) et des TG (E) plasmatiques dans les différentes fractions lipoprotéiques après séparation par FPLC chez des souris contrôles ou ApoF-KO après un jeûne de 5 heures (n= 3 pool de 2/3 souris par groupe). (F) Calcul de l'aire

sous la courbe de (E). * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ par rapport au contrôle par t-test Toutes les données sont présentées sous forme de moyennes \pm SEM

Contrairement à ce qui avait été observé chez les souris Ad-shApoF, la déficience totale de l'*ApoF* ne semble pas modifier la capacité de sécrétion des TG par le foie (**Figure 30A**) bien que le calcul de la production de TG suggère une tendance à l'augmentation (**Figure 30B**). De manière surprenante, le calcul du FCR suggère une tendance à l'augmentation du catabolisme des TG chez ces souris (**Figure 30C**). La mesure des concentrations hépatiques en TG et en TC chez des souris à jeun, ne montre pas de différences significatives entre les souris contrôles et ApoF-KO (**Figure 30D et E**). Toutefois, on observe une forte variabilité au sein du groupe contrôle qui ne comporte que 3 souris. Ces résultats doivent donc être reproduits avec un plus grand effectif pour conclure sur l'impact de la délétion de l'*ApoF* sur les concentrations de lipides hépatiques.

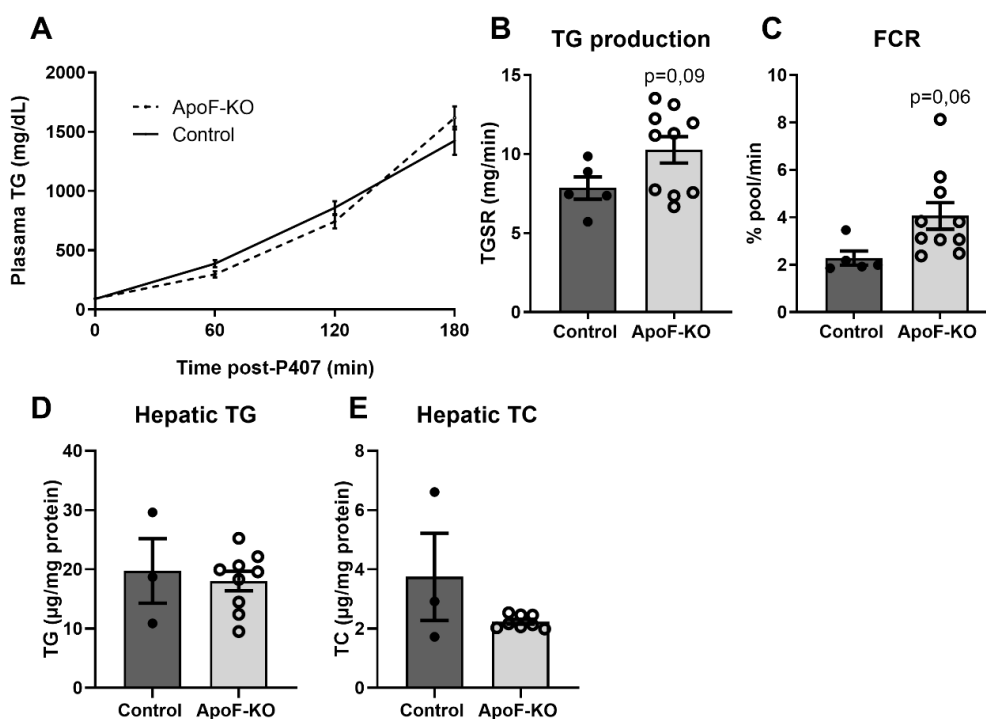


Figure 30 : La déficience totale de l'ApoF ne modifie pas la sécrétion des VLDL-TG par le foie. TG plasmatiques (A) et calcul de la production de TG (B) et du FCR (C) après l'injection i.p. de P407 (1g/kg de poids corporel) (n=5-10 par groupe). Concentration hépatique de TG (D) et de TC (E) chez des souris contrôles ou ApoF-KO après un jeûne de 5 heures (n=3-9 par groupe). p-value par rapport au contrôle par t-test. Toutes les données sont présentées sous forme de moyennes \pm SEM.

6. La surexpression de l'APOF favorise la clairance des *remnants* en favorisant leur capture par le foie

Nos précédents résultats indiquent que la surexpression de l'APOF chez les souris entraîne une réduction des concentrations plasmatiques en TG, bien que la production hépatique de

VLDL-TG soit augmentée. Ces données suggèrent que la surexpression de l'*APOF* pourrait également favoriser le catabolisme des TG circulants, soit par l'activation de la lipolyse, soit par l'augmentation de leur captation par leurs récepteurs. Pour tester ces hypothèses, nous avons quantifié la clairance des TG plasmatiques chez des souris Ad-hApoF et Ad-GFP. Nous avons, tout d'abord, mesuré la clairance des TG en période post-prandiale (après un bolus d'huile). Comme suggéré par l'augmentation du FCR chez les souris surexprimant l'*APOF* (**Figure 26C**), nous avons observé une forte réduction à la fois du pic de TG et de l'aire sous la courbe, 2 heures après le gavage (**Figure 31A**). Ceci suggère que la surexpression de l'*APOF* conduit à une accélération de la clairance des TG plasmatiques ou à une réduction de la sécrétion des TG par l'intestin. Compte tenu de la spécificité hépatique de l'adénovirus de sérotype 5 que nous utilisons ici²³⁷, il est fort probable que la surexpression de l'*APOF* module plutôt le catabolisme des TG dans le plasma bien que des expériences complémentaires seraient nécessaires pour le confirmer.

Pour mieux définir le rôle de l'ApoF dans la clairance des VLDL, nous avons d'abord examiné l'impact de la surexpression de l'ApoF sur les activités de la LPL et/ou de la HL, deux enzymes responsables de l'hydrolyse intravasculaire des TG²³⁸. Les activités LPL et HL ont été mesurées *ex vivo* dans du plasma post-héparine provenant de souris Ad-GFP et Ad-hApoF, et aucune différence n'est observée avec la surexpression de l'*APOF* (**Figure 31B**). Nous avons également mesuré les niveaux plasmatiques de l'ApoC2, le co-facteur de la LPL, et de l'ApoC3, un inhibiteur important de son activité. La concentration plasmatique de l'ApoC2 est diminuée chez les souris Ad-hApoF (**Figure 31C**) alors que nous n'observons pas de différences pour l'ApoC3 entre les souris Ad-hApoF et Ad-GFP (**Figure 31D**). Toutefois, le ratio ApoC2/ApoC3 est similaire entre les deux groupes (**Figure 31E**) suggérant que l'activité de la LPL n'est pas modifiée par la surexpression de l'*APOF*. D'autre part, la concentration plasmatique de l'ApoE, un ligand pour la capture des *remnants* par les récepteurs, a également été mesurée mais n'a montré aucune différence avec la surexpression de l'*APOF* (**Figure 31F**). Collectivement, ces résultats suggèrent que l'ApoF ne conduit probablement pas à une augmentation de la clairance des TG par une augmentation de la lipolyse.

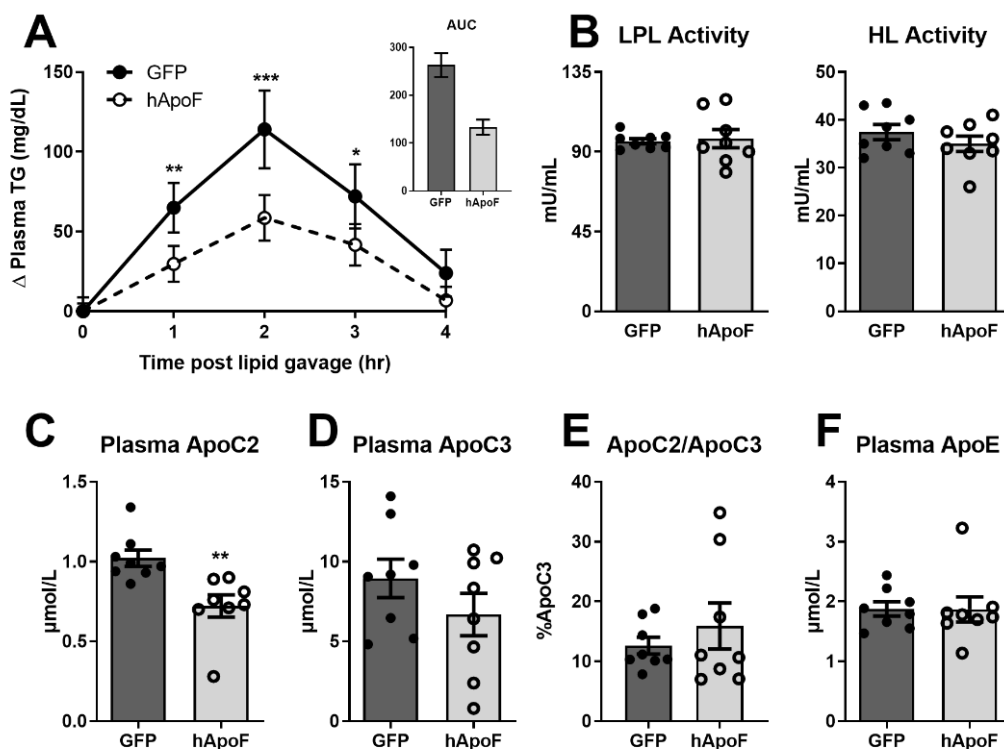


Figure 31 : La surexpression de l'APOF favorise la clairance des particules riches en TG par un mécanisme indépendant de la lipolyse intravasculaire. (A) TG plasmatique corrigée par rapport à la ligne de base et calcul de l'aire sous la courbe après un gavage à l'huile d'olive chez des souris Ad-GFP ou Ad-hApoF après un jeûne de 5 heures ($n=9-10$ par groupe). (B) Activités de la LPL et la HL plasmatiques après une injection d'héparine chez des souris Ad-GFP ou Ad-hApoF après un jeûne de 16 heures ($n=8$ par groupe). Concentration plasmatique de l'ApoC2 (C), de l'ApoC3 (D), du ratio ApoC2/ApoC3 (E) et de l'ApoE (F) chez des souris Ad-GFP ou Ad-hApoF après un jeûne de 5 heures ($n=8$ par groupe). * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$ par rapport au contrôle par t-test ou ANOVA à deux voies pour (A). Les comparaisons multiples ont été évaluées par le test post-hoc LSD de Fisher pour (A). Toutes les données sont présentées sous forme de moyennes \pm SEM.

Pour évaluer plus précisément l'impact de la surexpression de l'APOF sur la clairance plasmatique des VLDL, nous avons réalisé une expérience permettant le suivi de particules de type VLDL doublement marquées avec des isotopes radioactifs²²⁶ chez des souris Ad-GFP et Ad-hApoF (collaboration avec le Pr. Patrick Rensen, Leiden). Dans ces particules, les acides gras composant les TG sont marqués au $[^3\text{H}]$ ($[^3\text{H}]$ -TO) et ceux composant le cholestérol au $[^{14}\text{C}]$ ($[^{14}\text{C}]$ -CO). La décroissance plasmatique et la capture de $[^3\text{H}]$ TO, qui reflètent l'hydrolyse des TG radiomarqués par les lipases générant des acides gras captés par les différents tissus, sont similaires dans les deux groupes. Comme attendu, la majorité des acides gras marqués libérés sont captés par les deux dépôts de tissus adipeux brun collectés (iBAT et sBAT, **Figure 32A et B**). Il est intéressant de noter que la décroissance plasmatique du $[^{14}\text{C}]$ -CO, qui reflète principalement l'endocytose des *remnants* par les récepteurs, était légèrement mais significativement plus élevée chez les souris Ad-hApoF que chez les contrôles Ad-GFP (**Figure 32C**). Conformément au rôle dominant du foie dans la clairance des *remnants* chez les souris, le foie a montré une meilleure capacité à capter le

[¹⁴C]CO dans les groupes Ad-hApoF et Ad-GFP, mais l'absorption du cholestérol par le foie à 15 minutes était 30 % plus élevée ($p < 0,05$) dans le groupe Ad-hApoF que dans le groupe Ad-GFP (**Figure 32D**). Ces résultats suggèrent que la surexpression de l'APOF entraîne une réduction des concentrations plasmatiques de TG par le biais d'une augmentation de la captation des *remnants* de VLDL par le foie.

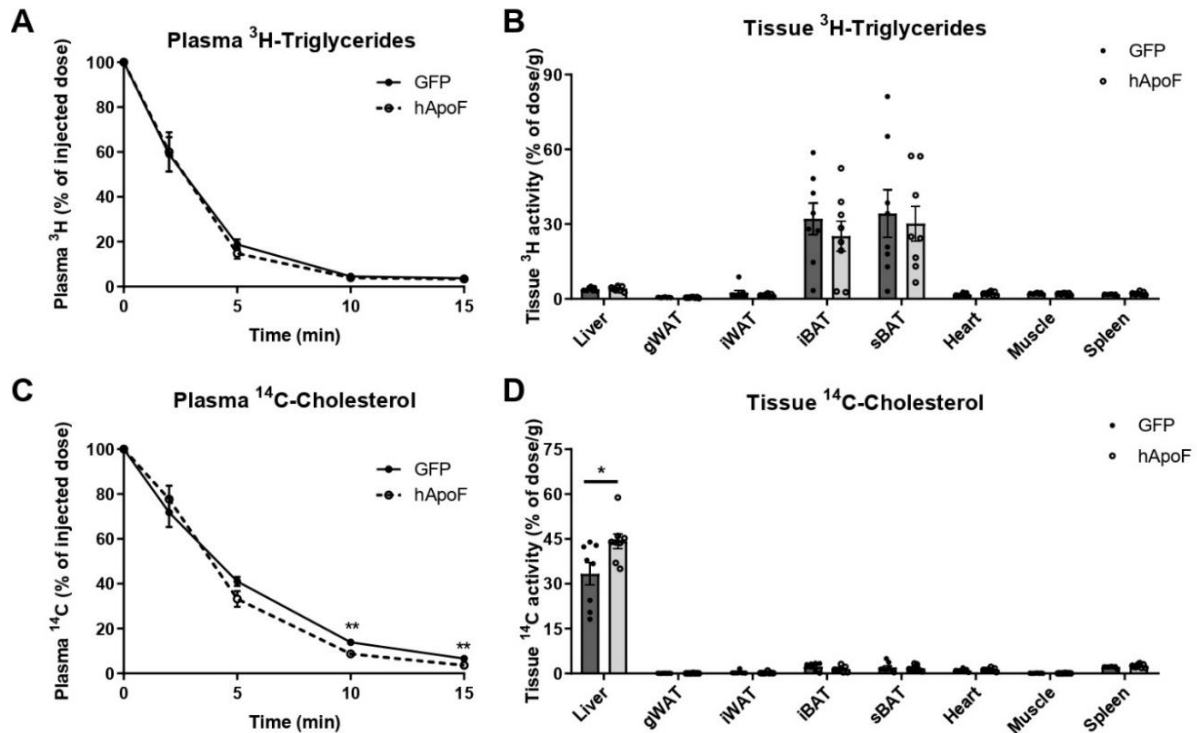


Figure 32 : La surexpression de l'APOF favorise la capture des remnants par le foie. Décroissance du [³H] (A) et du [¹⁴C] (C) dans le plasma et capture par les différents organes collectés (B et D) après l'injection i.v. de particules de type VLDL, doublement marquées au [³H]TO et au [¹⁴C]CO ($n=7-8$ par groupe). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ par rapport au contrôle par test t ou ANOVA à deux voies. Toutes les données sont présentées sous forme de moyennes \pm SEM.

Les résultats ci-dessus sont obtenus dans les souris C57BL6/J qui est un modèle de souris dont les concentrations plasmatiques de lipides sont faibles et qui ne permet donc pas de visualiser des changements de ce paramètre de façon optimale. C'est pourquoi nous avons choisis de reproduire ces expériences chez des souris mâles APOE*3-Leiden.CETP, un modèle de dyslipidémie. Le transgène APOE*3-Leiden engendre une réduction de la clairance des lipoprotéines riches en TG (c'est-à-dire des chylomicrons et des VLDL), et le transgène CETP favorise le transfert de cholestérol dans les LDL. Toutefois, il est nécessaire que ces souris soient nourries avec un régime de type « *Western Diet* » supplémenté en cholestérol, pour que leur profil lipoprotéique soit plus proche de celui de l'homme²³⁹. Quatre jours après l'injection des adénovirus, la concentration plasmatique de TG semble diminuée chez les souris Ad-hApoF (**Figure 33A**), bien que cette différence ne soit pas significative probablement à cause du faible nombre de souris par groupe ($n=4-5$). La décroissance plasmatique de [³H]TO tend à être plus élevée chez les souris Ad-hApoF (**Figure 33B**). En

effet, nous observons une tendance à l'augmentation de la capture des acides gras libres marqués par les deux dépôts de tissu adipeux brun collectés (**Figure 33C**). Toutefois, il est difficile de conclure sur l'impact de la surexpression de l'*APOF* sur la clairance du cholestérol dans cette expérience. Alors que la concentration de TC est similaire entre les deux groupes (**Figure 33D**), la décroissance plasmatique du [^{14}C]-CO semble plus élevée 2 et 5 min après l'injection des particules de type VLDL chez les souris Ad-hApoF (**Figure 33E**). Néanmoins, nous ne détectons pas de différence de l'augmentation de la capture de [^{14}C]CO dans un des tissus collectés entre les souris Ad-GFP et Ad-hApoF (**Figure 33F**). Ces résultats suggèrent que la surexpression de l'*APOF* dans le modèle *APOE3*Leiden.CETP* entraîne une réduction des concentrations plasmatiques de TG par le biais d'une augmentation de la lipolyse intravasculaire. Toutefois, il est important de mentionner que cette étude est préliminaire et que ces résultats doivent à être confirmés avec un plus grand effectif.

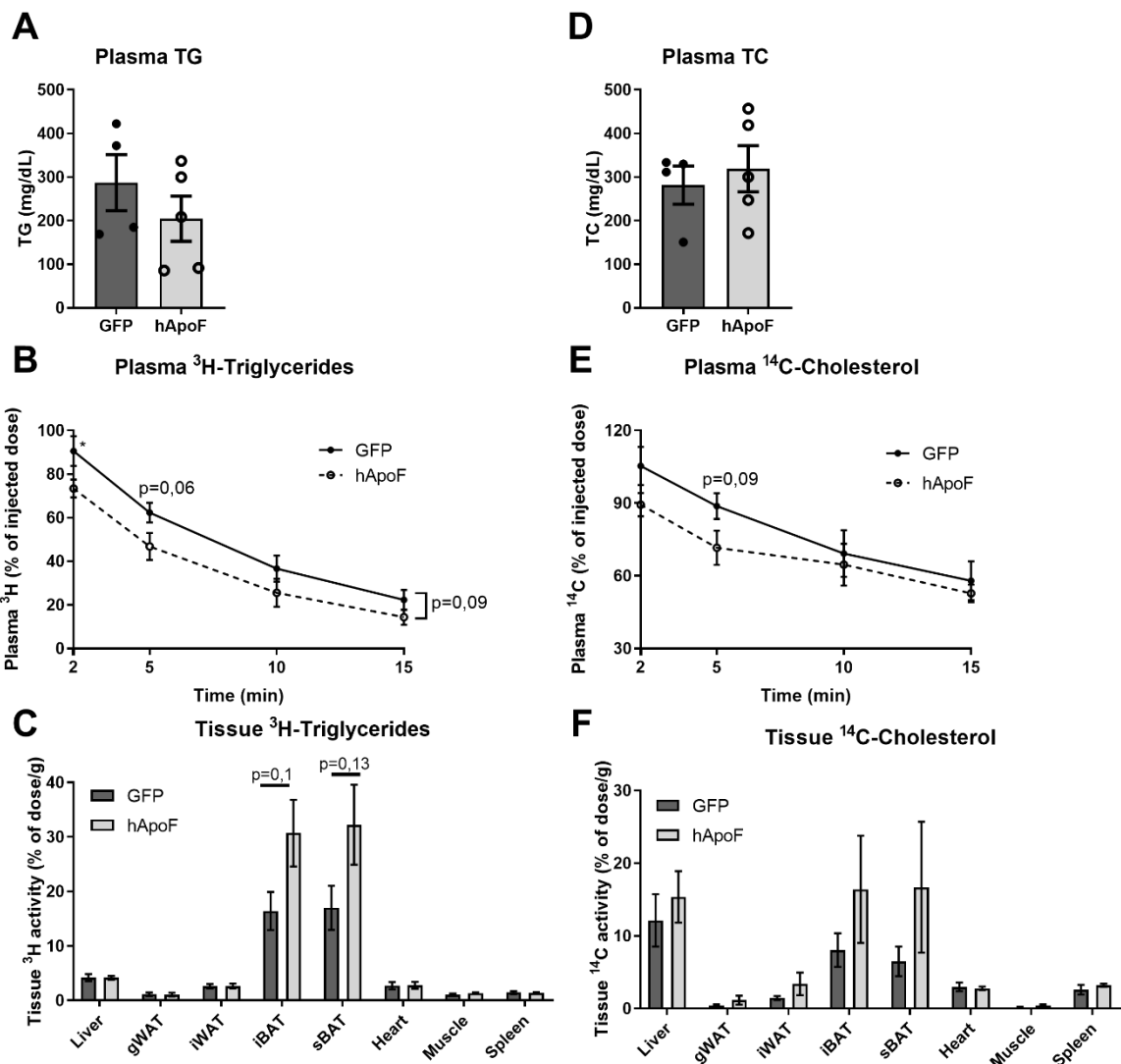


Figure 33 : La surexpression de l'*APOF* chez les souris *APOE3*Leiden.CETP* favorise la capture des acides gras par le tissu adipeux brun. Concentration plasmatique des TG (A) et du TC (D) chez des souris *APOE3*3-Leiden.CETP* injectées avec l'Ad-GFP ou l'Ad-hApoF après un jeûne de 5 heures (n=4-5 par groupe).

Décroissance du [^3H] (B) et du [^{14}C] (E) dans le plasma et capture par les organes (C et F) après l'injection i.v. de particules de type VLDL, doublement marquées au [^3H]TO et au [^{14}C]CO (n=4-5 par groupe). p-value par rapport au contrôle par test t ou ANOVA à deux voies. Les comparaisons multiples ont été évaluées par le test post-hoc LSD de Fisher pour (B) et (E). Toutes les données sont présentées sous forme de moyennes \pm SEM.

7. La surexpression de l'APOF active la voie SREBP2

Afin d'identifier les voies impliquées dans l'augmentation de la clairance des particules riches en TG induite par la surexpression de l'APOF, nous avons réalisé une analyse transcriptomique sur des foies de souris Ad-hApoF et Ad-GFP. L'analyse d'enrichissement des ensembles de gènes (GSEA) a révélé que les gènes impliqués dans la biosynthèse et, plus globalement, dans le métabolisme du cholestérol sont les plus affectés par la surexpression de l'APOF (**Figure 34A**). En effet, les souris Ad-hApoF ont montré une augmentation de l'expression des gènes impliqués dans l'absorption des lipoprotéines liées à l'ApoB, tels que *Ldlr*, ses deux régulateurs clés, *Myliip* (codant pour IDOL) et *Pcsk9*, mais aussi *Lrp1* (**Figure 34B**). Il est intéressant de noter que la plupart de ces gènes sont régulés transcriptionnellement par SREBP2.

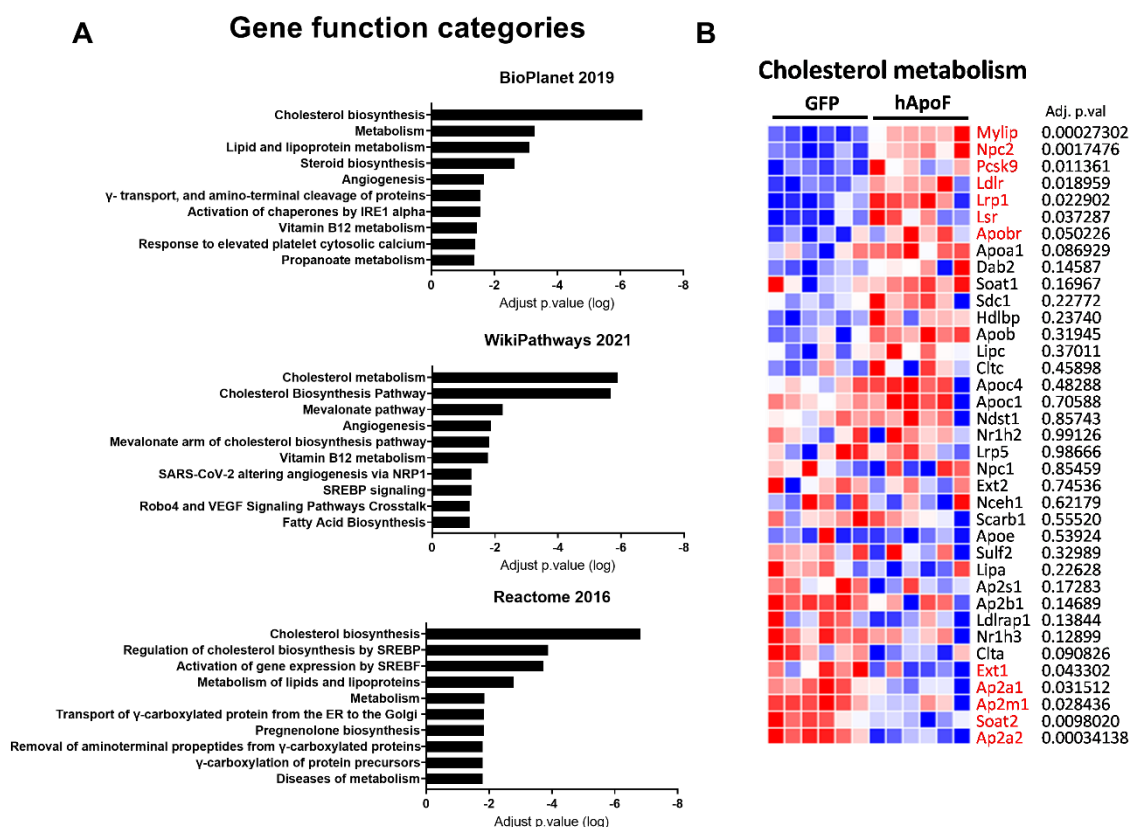


Figure 34 : La surexpression de l'APOF est associée à une activation des gènes impliqués dans le métabolisme du cholestérol. (A) Top 10 des voies de signalisation activées par la surexpression de l'ApoF selon différentes bases de données (BioPlanet, WikiPathways et Réactome). (B) Expression relative des gènes liés au métabolisme du cholestérol analysés par les puces à ARN.

Un paradigme similaire conduisant à une augmentation de la clairance des *remnants* par l'activation de la voie SREBP2 est le traitement par statine²⁴⁰. Notre groupe a précédemment décrit une signature transcriptomique hépatique du traitement par les statines dans la cohorte de patients que nous avons utilisée pour identifier l'APOF¹⁸⁰. Pour vérifier si une signature génique similaire résulte de la surexpression de l'APOF chez les souris, nous avons créé un ensemble des 100 gènes les plus régulés par le traitement avec les statines (correspondant à un FDR<0,005) et avons testé si ces gènes étaient enrichis dans les foies des souris Ad-hApoF ou Ad-GFP. De manière intéressante, nous avons observé un fort enrichissement de ces gènes dans le foie des souris surexprimant l'APOF (NES = 2,52, $p \approx 4,6 \times 10^{-9}$, **Figure 35**). Collectivement, ces données suggèrent que la surexpression de l'APOF améliore la clairance des *remnants* par l'activation de la voie SREBP2 dans le foie.

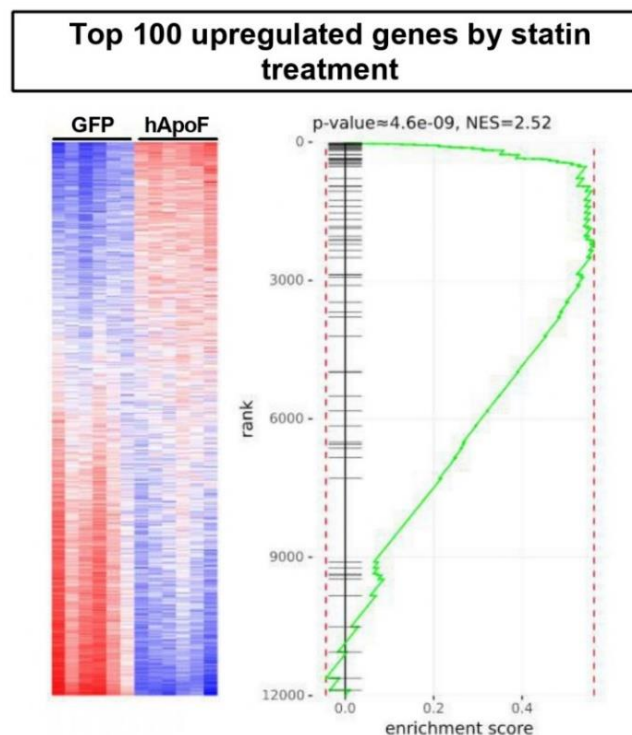


Figure 35 : La surexpression de l'APOF active la voie SREBP2. Analyse GSEA utilisant les 100 gènes les plus régulés par le traitement aux statines dans le foie de souris Ad-GFP or Ad-hApoF.

L'expression de plusieurs récepteurs impliqués dans la capture des particules, notamment *Ldlr* et *Lrp1*, sont augmentés chez les souris Ad-hApoF (**Figure 34B**). Afin de déterminer si la surexpression de l'APOF favorise la clairance des particules en augmentant le nombre de récepteurs à la membrane, nous avons mesuré la quantité de protéines LDLR, LRP1 et Syndecan-1 dans le foie des souris ayant reçu l'injection des particules de type VLDL (**Figure 32D**). Bien que les quantités de LRP1 et de Syndecan-1 tendent à être légèrement augmentées dans le foie des souris Ad-hApoF, la quantité de LDLR chez ces souris n'est pas différente de celle des souris Ad-GFP (**Figure 36A et B**). Toutefois, LDLR et LRP1

favorisent la clairance par l'endocytose des particules. Nous avons donc extrait les protéines membranaires afin de distinguer la quantité de récepteurs présents à la membrane de ceux présents à l'intérieur de la cellule. Alors que la quantité de LRP1 et de Syndecan-1 reste la même entre les deux groupes, nous observons que la quantité de LDLR à la membrane est diminuée de 30% chez les souris Ad-hApoF (**Figure 36C et D**). Ces résultats sont cohérents avec la forte induction de l'expression de *Myliip* et *Pcsk9*, qui empêche le recyclage du LDLR à la membrane, observée dans le foie des souris Ad-hApoF (**Figure 34B**), bien que nous n'ayons pas vérifié leur quantité protéique dans le foie et le plasma. Néanmoins, l'estimation de la quantité de protéines intracellulaires suggère une augmentation de l'endocytose de ces différents récepteurs lorsque les souris surexpriment l'*APOF* (**Figure 36E**) et soutiennent donc l'hypothèse selon laquelle l'ApoF favorise la capture des particules par le foie.

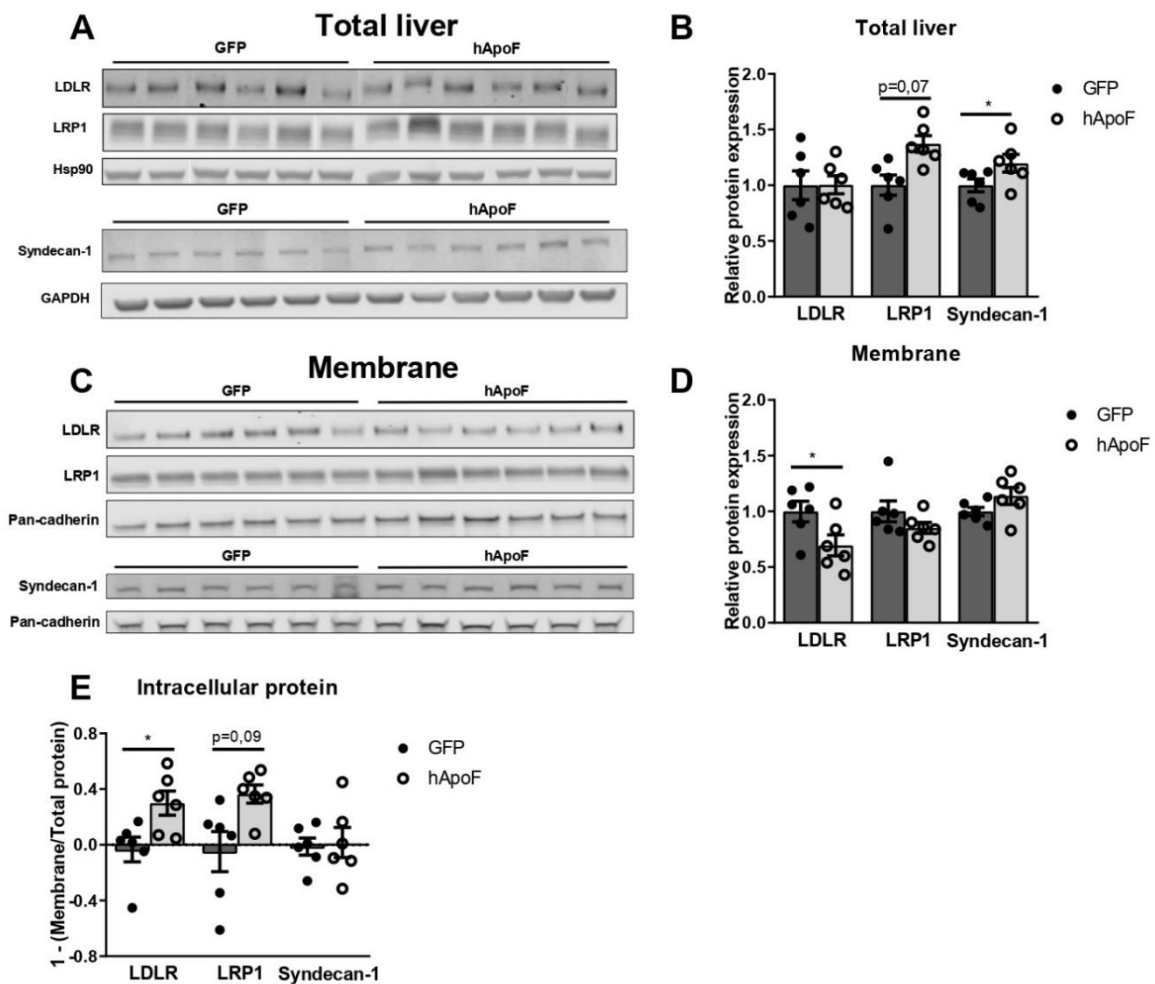


Figure 36 : La surexpression de l'*APOF* favorise l'endocytose des récepteurs des lipoprotéines dans le foie. Western blot de LDLR, LRP1 et Syndecan-1 dans le foie total (A) et dans la fraction membranaire (C) chez les souris Ad-GFP ou Ad-hApoF 15 minutes après l'injection de particules de type VLDL (n=6 par groupe). Quantification de l'expression des récepteurs dans le foie total (B) et dans la fraction membranaire (D). (E) Estimation de la quantité de protéine intracellulaire à partir de (C) et (D). *p<0,05 par rapport au contrôle par t-test. Toutes les données sont présentées sous forme de moyennes ± SEM.

8. La diminution de l'expression de l'*APOF* diminue la capture des VLDL et des LDL *in vitro*

Nos précédents résultats *in vivo* suggèrent que la surexpression de l'*APOF* entraîne une réduction des concentrations plasmatiques en TG en améliorant la capture des *remnants* par le foie. Sur la base de ces résultats, nous avons vérifié si la modification de l'expression de l'*APOF* dans les hépatocytes est suffisante pour moduler la capture des particules. Pour cela, des IHH ont été transfectées avec des siARNs dirigés contre l'ApoF (siApoF) ou non ciblés (siCtrl) et incubées avec des VLDL ou des LDL marquées avec un composé fluorescent (Dil). L'activité de capture des particules marquées est directement proportionnelle à la fluorescence intracellulaire mesurée après incubation²⁴¹. En accord avec nos résultats ci-dessus, nous observons que les cellules transfectées par un siApoF réduisent d'environ 20% la captation des Dil-VLDL (**Figure 37A et 6B**) et une réduction similaire de la capture des Dil-LDL (**Figure 37C et 6D**). Toutefois, cet effet ne semble pas être la conséquence d'une réduction de la quantité de récepteurs dans le foie comme le suggère l'absence de différence d'expression en ARNm de *LDLR*, *LRP1* et *PCSK9* entre les cellules transfectées avec le siCtrl et le siApoF (**Figure 37E**). Ces résultats suggèrent que la modulation de l'expression de l'*APOF* dans l'hépatocyte modifie leur capacité de capture des VLDL et des LDL. Toutefois, le mécanisme d'action de l'ApoF dans ce processus reste à déterminer.

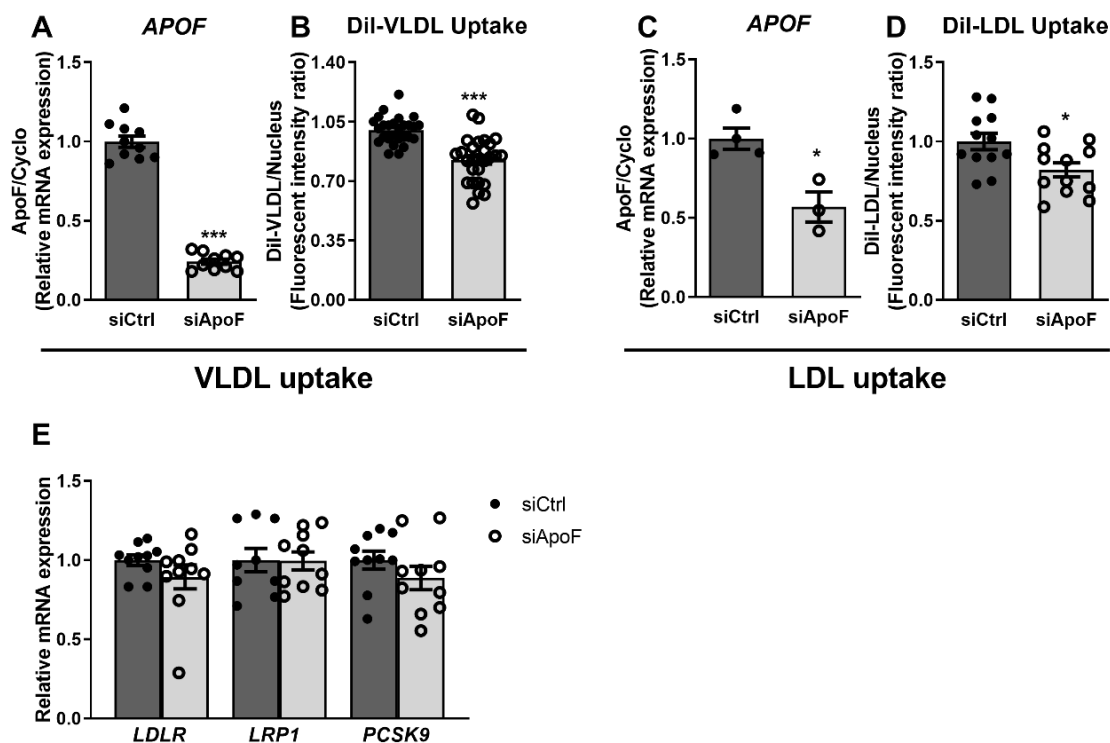


Figure 37 : La diminution de l'expression de l'*APOF* diminue la capture des Dil-VLDL et Dil-LDL *in vitro*.
(A) ARNm de l'ApoF dans les IHH transfectées avec un siCtrl ou un siApoF après le traitement avec les VLDL

(n=3 par conditions). (B) Fluorescence intracellulaire du Dil dans les IHH siCtrl ou siApoF après un traitement d'une nuit avec les VLDL marquées au Dil (n=6-9 par conditions). (C) ARNm de l'ApoF dans les IHH transfectées avec un siCtrl ou un siApoF après le traitement avec les LDL (n=3 par conditions). (D) Fluorescence intracellulaire du Dil dans les IHH siCtrl ou siApoF après 3 heures de traitement avec les LDL marquées au Dil (n=6 par conditions). (E) ARNm de LDLR, LRP1, PCSK9 dans les IHH transfectées avec un siCtrl ou un siApoF après le traitement avec les VLDL (n=9 par conditions). *p<0,05, ***p<0,001 par rapport au contrôle par t-test. Toutes les données sont présentées sous forme de moyennes ± SEM de 3 expériences indépendantes.

9. La surexpression de l'APOF chez les souris APOE2-KI entraîne une accumulation de cholestérol dans les particules LDL

Afin de mieux comprendre le mécanisme d'action de l'ApoF, nous avons étudié l'effet de sa surexpression dans un modèle de souris où la clairance des *remnants* est retardée. Nous avons choisi le modèle de souris APOE2-KI, qui présente une augmentation marquée des TG plasmatiques et du TC par rapport aux souris C57BL6/J ou ApoE3-KI²⁴², en raison d'une affinité réduite de l'APOE2 pour le LDLR²⁴³. Contrairement aux souris C57BL6/J, la surexpression de l'APOF chez les souris APOE2-KI ne diminue pas la concentration plasmatique de TG (**Figure 38A**) mais augmente très légèrement le taux de VLDL-TG (**Figure 38B**). De manière surprenante, nous observons une augmentation importante de la quantité de protéine ApoB dans la fraction LDL du plasma des souris Ad-hApoF (**Figure 38C**). Puisqu'il y a une ApoB par LDL, cela suggère que le nombre de particules LDL est plus élevée chez les souris Ad-hApoF vis-à-vis des souris contrôles. En effet, bien que la concentration plasmatique de TC ne soit pas significativement augmentée (**Figure 38D**), on observe une forte accumulation de LDL-C chez les souris Ad-hApoF ainsi qu'une légère augmentation des VLDL-C (**Figure 38E**). De plus, alors que les expressions de *Lrp1*, *Syndecan-1* et *Pcsk9* ne sont pas significativement modifiées, l'expression du *Ldlr*, qui assure la majorité de la clairance des LDL, est réduite de 25% dans le foie des souris Ad-hApoF (**Figure 38F**). Ces résultats suggèrent que, dans un modèle génétique de clairance retardée, la surexpression de l'APOF ne semble plus capable d'augmenter la capture des *remnants*. Ces résultats apportent des informations concernant le mécanisme d'action de l'ApoF. En effet, il semble exister un lien important entre la clairance des lipoprotéines via l'ApoE et l'ApoF qui pourrait être perturbé par la présence de l'APOE2 dans ce modèle.

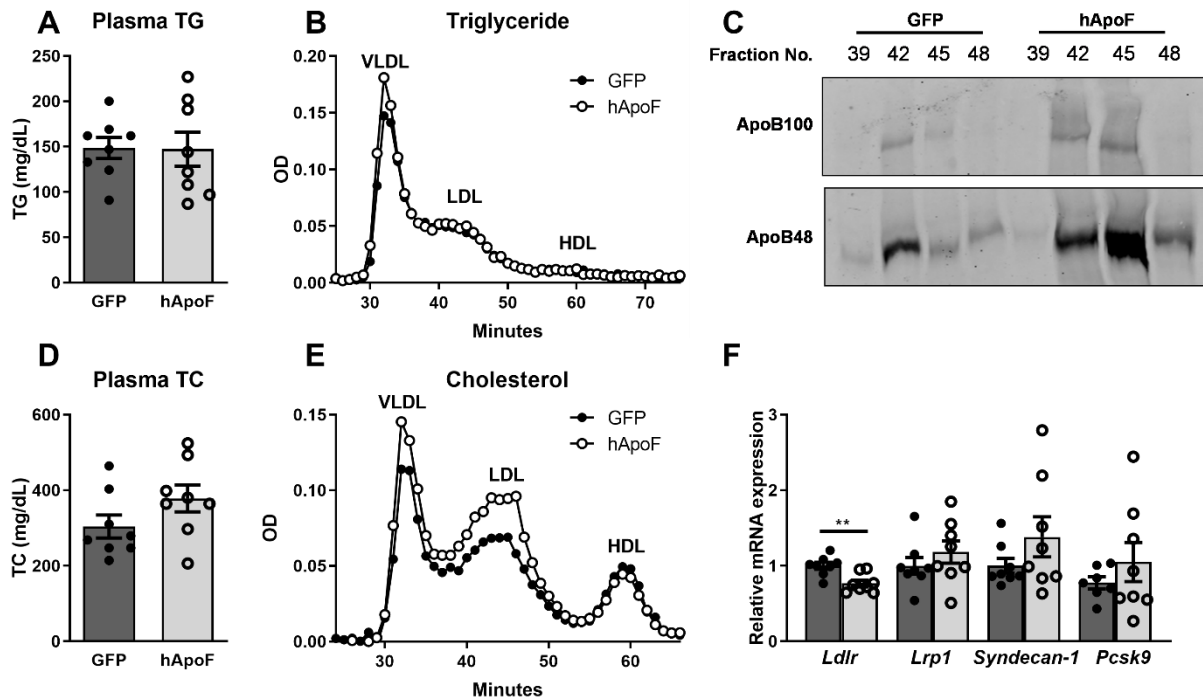


Figure 38 : La surexpression de l'APOF chez les souris APOE2-KI entraîne l'accumulation de LDL-C. Concentration plasmatique des TG (A) et du TC (D) chez les souris APOE2-KI Ad-GFP ou Ad-hApoF après 5 heures de jeûne (n=8 par groupe). (C) Western blot de l'ApoF dans la fraction LDL du plasma de souris APOE2-KI Ad-GFP ou Ad-hApoF après un jeûne de 5 heures (n=1 pool de 8 souris par groupe). Mesure des TG (B) et du cholestérol (E) plasmatiques dans les différentes fractions lipoprotéiques après séparation par FPLC chez des souris APOE2-KI Ad-GFP ou Ad-hApoF après un jeûne de 5 heures (n= 1 pool de 8 souris par groupe). (F) ARNm de *Ldlr*, *lrp1*, *syndecan-1* et *Pcsk9* dans le foie de souris APOE2-KI Ad-GFP ou Ad-hApoF après un jeûne de 5 heures. *p<0,05, ***p<0,001 par rapport au contrôle par t-test. Toutes les données sont présentées sous forme de moyennes ± SEM.

10. Etude des mécanismes de régulation de l'ApoF

Comme décrit lors de l'introduction, les acteurs impliqués dans la régulation de l'ApoF sont mal connus à l'heure actuelle. Plusieurs études *in vitro* suggèrent que les récepteurs nucléaires LXR et PPAR α pourraient réprimer l'expression de l'ApoF²⁰⁸ alors que le récepteur nucléaire FXR pourrait induire son expression²⁰⁹. Toutefois, ces différentes études ne retrouvent pas systématiquement ces mêmes effets et ont, pour la plupart, été réalisées dans différentes lignées cellulaires hépatocytaires. Afin de conclure sur une potentielle régulation de l'ApoF par ces 3 récepteurs nucléaires, nous avons choisi de tester l'effet des agonistes synthétiques de LXR (GW3965), PPAR α (GW7647) et FXR (GW4064) dans des hépatocytes primaires humains. Le traitement de ces hépatocytes par les agonistes LXR, PPAR α et FXR montrent une induction de leur gènes cibles *SREBP1c* (Figure 39A), *PDK4* (Figure 39B) et *BSEP* (Figure 39C) confirmant l'activation de ces différents récepteurs nucléaires. Cependant, dans ces conditions de traitement, l'expression de l'APOF reste

inchangée. Ces résultats suggèrent que LXR, PPAR α et FXR ne régulent pas directement l'expression de l'*APOF* dans les hépatocytes primaires humains.

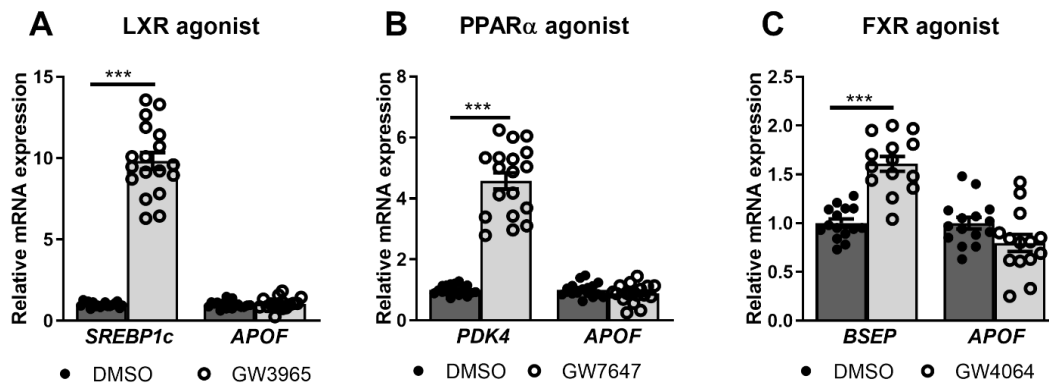


Figure 39 : LXR, PPAR α et FXR ne régulent pas l'expression de l'*APOF* *in vitro*. (A) ARNm de *SREBP1c* et *APOF* dans des hépatocytes humains primaires après un traitement de 16 heures au DMSO ou au GW3965 ($n=18$ par conditions). (B) ARNm de *PDK4* et *APOF* dans des hépatocytes humains primaires après un traitement de 16 heures au DMSO ou au GW7647 ($n=18$ par conditions). (C) ARNm de *BSEP* et *APOF* dans les hépatocytes humains primaires après un traitement de 16 heures avec du DMSO ou du GW4064 ($n=18$ par conditions). *** $p<0,001$ par rapport au contrôle par test t. Toutes les données sont présentées sous forme de moyennes \pm SEM de 3 expériences indépendantes.

D'autres part, des études ont montré que l'expression de l'*ApoF* était réduite dans le foie des souris nourries avec un régime riche en acides gras saturés, supplémenté ou non en cholestérol²¹¹. Afin de déterminer si les acides gras libres et le cholestérol ont un rôle direct sur la régulation de l'*ApoF*, nous avons stimulé une lignée cellulaire, les IHH, par de l'acide oléique ou par des LDL et mesuré l'influence de ces traitements sur l'expression de l'*APOF*. Alors que la stimulation par l'acide oléique augmente l'expression de l'enzyme *CPT1* (**Figure 40A**), une enzyme clé de la β -oxydation, l'expression de l'*APOF* n'est pas modifiée (**Figure 40B**). D'autres part, la stimulation des IHH par les LDL, favorisant l'augmentation du cholestérol intracellulaire, inhibe l'expression du facteur de transcription *SREBP2* (**Figure 40C**), sans modifier l'expression de l'*APOF* (**Figure 40D**). Ces résultats suggèrent que les acides gras libres et le cholestérol ne sont pas capables de moduler directement l'expression de l'*APOF* dans les IHH. De manière intéressante, nous avons observé que l'expression de l'*APOF* est fortement induite après une stimulation avec des concentrations de glucose élevée, capable d'induire l'expression de la pyruvate kinase (LPK), une enzyme clé de la glycolyse (**Figure 40E et F**). De plus, nous avons observé que son expression était également augmentée dans le foie de souris 8h après un repas riche en glucides comparé à des souris à jeun (**Figure 40G et H**). Ces résultats suggèrent que l'expression de l'*APOF* est augmentée en condition post-prandiale.

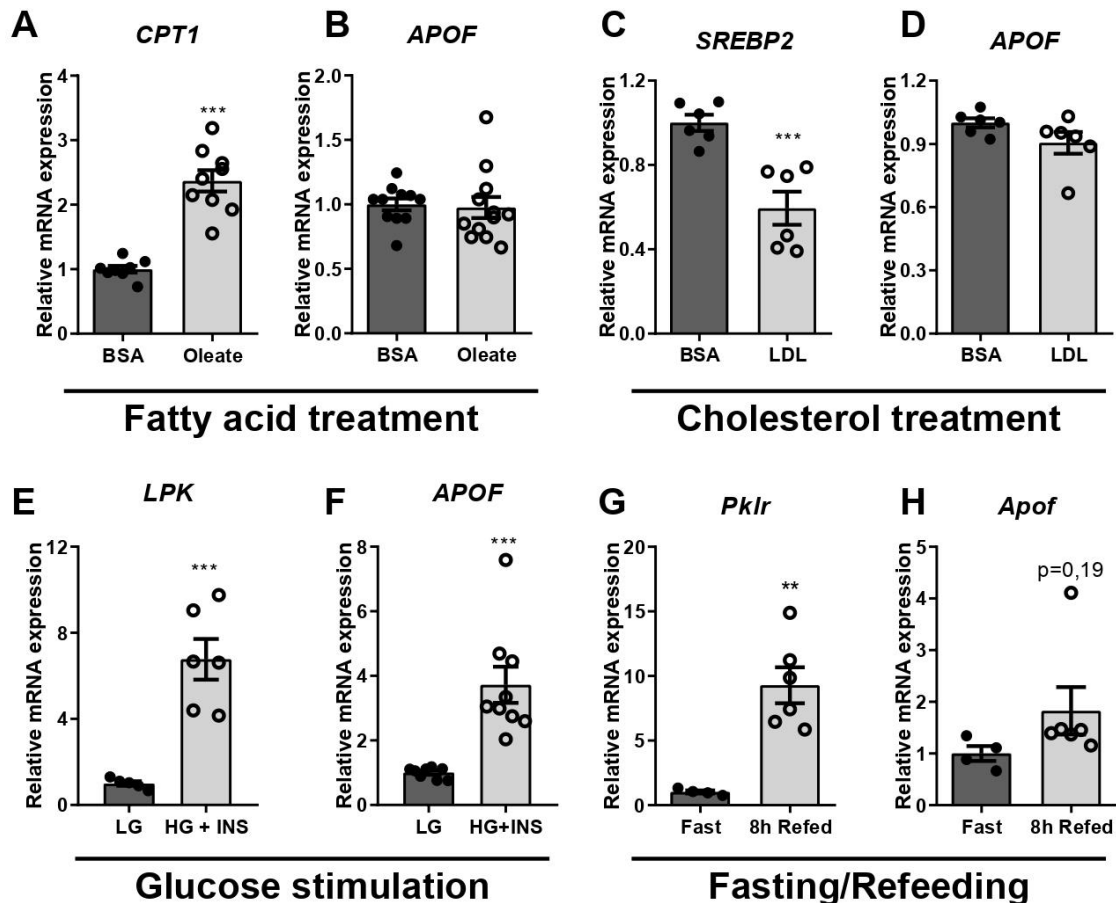


Figure 40 : L'expression de l'*APOF* est augmentée en condition post-prandiale. ARNm de *CPT1* (A) et de l'*APOF* (B) dans les IHH après un traitement de 16 heures avec de la BSA ou de l'acide oléique ($n=8-12$ par conditions). ARNm de *SREBP2* (C) et *APOF* (D) dans les IHH après un traitement de 16 heures avec de la BSA ou des LDL ($n=6$ par conditions). ARNm de la *LPK* (E) et de l'*APOF* (F) dans les IHH après un traitement de 16 heures avec 1mM ou 11mM de glucose ($n=8-9$ par conditions). ARNm de la *Lpk* (G) et de l'*Apof* (H) dans les foies de souris après un jeûne de 24 heures ou 8 heures après un repas ($n=4-6$ par conditions). * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$ par rapport au contrôle par test *t*. Les données sont présentées sous forme de moyennes \pm SEM de 3 expériences indépendantes pour (A), (B), (E) et (F) ou 2 expériences indépendantes pour (C) et (D).

Nous avons précédemment observée que l'expression de l'*APOF* est réduite dans les foies de patients atteints de NASH (**Figure 23B**). Sachant que l'inflammation est une composante majeure de la NASH, nous avons cherché à déterminer si des cytokines pro-inflammatoires modulent l'expression de l'ApoF. La stimulation des IHH par le $TNF\alpha$ induit fortement l'expression de *CXCL10*, impliqué dans le recrutement des monocytes (**Figure 41A**), et diminue de presque 40% l'expression de l'*APOF* (**Figure 41B**). De plus, l'analyse transcriptomique des foies de patients atteint de NAFLD montre une forte corrélation entre l'expression de l'*APOF* et l'expression de *CXCL10* (**Figure 41C**). Collectivement, ces résultats suggèrent que l'inflammation inhibe l'expression de l'ApoF. Sachant que NF- κ B régule l'expression de *CXCL10*²⁴⁴, on peut supposer que l'activation de cette voie conduit à l'inhibition de l'ApoF.

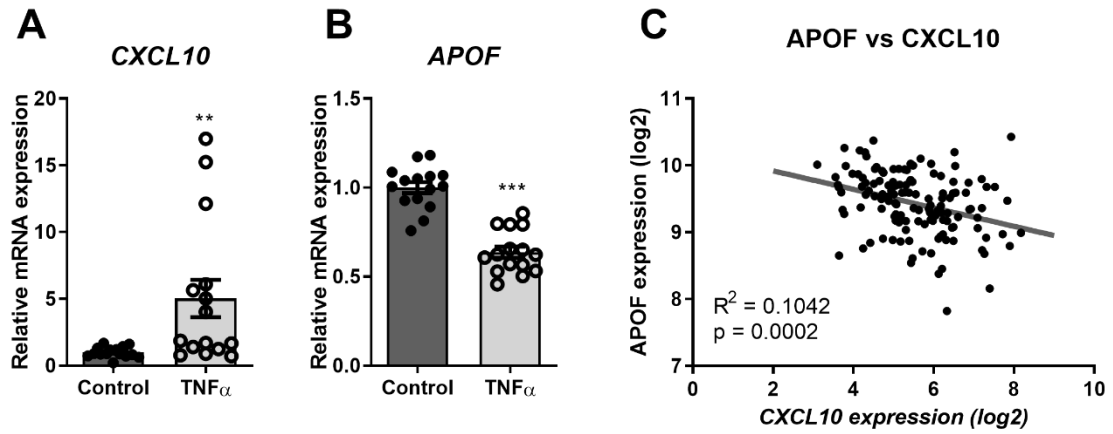


Figure 41 : L'expression de l'APOF est inhibée par le TNF α . ARNm de CXCL10 (A) et de l'APOF (B) dans les IHH après un traitement de 16 heures avec du TNF α (n=15 par conditions). (C) Relation entre l'expression hépatique de l'APOF et de CXCL10 dans une cohorte de patients atteint de NAFLD (n=133). **p<0,01, ***p<0,001 par rapport au contrôle par test t ou corrélation de spearman. Les données sont présentées sous forme de moyennes \pm SEM. (A) et (B) représentent la moyenne de 4 expériences indépendantes.

Conclusion de la première partie

Dans cette première partie, nous avons montré que la diminution de l'expression de l'*APOF* hépatique est associée à une augmentation de la stéatose hépatique et à une aggravation du profil lipidique plasmatique (augmentation des TG et des non-HDL-C et diminution du HDL-C) dans une cohorte de patients obèses. Collectivement, nos résultats suggèrent qu'un niveau élevé d'ApoF hépatique pourrait améliorer certaines composantes du syndrome métabolique. Notre étude fournit quelques explications sur le mécanisme qui pourrait expliquer ce rôle bénéfique de l'ApoF. En effet, nous avons constaté que la surexpression de l'*APOF* est associée à une diminution de la concentration plasmatique des TG à jeun. Dans un premier temps, nous avons montré que la surexpression de l'*APOF* favorise l'exportation des TG hépatiques en augmentant la sécrétion de VLDL et par conséquent augmente la délivrance des TG vers les tissus périphériques. D'autre part, nous démontrons que l'*APOF* favorise la clairance des TG. De plus, la surexpression de l'*APOF* semble augmenter la clairance des *remnants* en augmentant leur capture hépatique probablement via l'activation de la voie SREBP2. En conclusion, dans cette première partie, nous avons mis en évidence un nouveau rôle de l'ApoF dans la clairance des particules riches en TG. Dans le contexte de la NAFLD, l'augmentation de l'expression de l'*APOF* pourrait donc contribuer à diminuer le contenu hépatique en TG par une augmentation du flux lipidique entre le foie et les tissus périphériques.

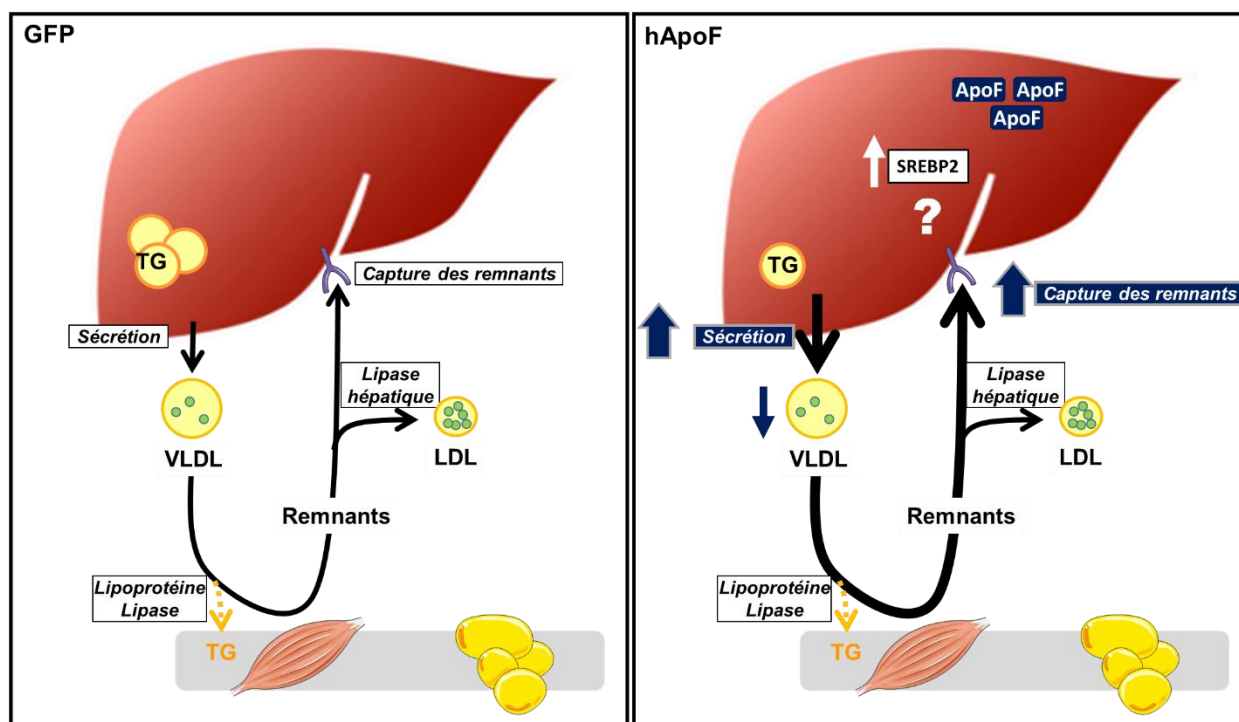


Figure 42 : Résumé des résultats de la partie 1.

Partie 2 : Rôle de l'ApoF dans le développement de la NAFLD

Nous avons précédemment montré que l'ApoF corrèle avec la stéatose hépatique et la dyslipidémie, deux caractéristiques de la NAFLD. Dans cette deuxième partie, nous avons cherché à déterminer si l'expression hépatique de l'APOF était dérégulée chez les patients atteints de NAFLD et quel est son rôle dans le développement de cette pathologie.

1. L'expression hépatique de l'APOF est diminuée dans la NAFLD

Afin d'identifier des cibles moléculaires potentiellement impliquées dans la pathogénèse de la NAFLD chez l'homme, le laboratoire a réalisé une analyse transcriptomique sur des biopsies de foie de patients issus d'une cohorte humaine de NAFLD (RESOLVE, Anvers). Ces analyses ont, à nouveau, identifié l'APOF comme un transcrit fortement corrélé de façon inverse avec le grade de stéatose uniquement chez les patients masculins de cette cohorte (**Figure 43A**). De plus, son expression est diminuée de moitié chez les patients atteints de NASH (**Figure 43B**). Nous observons également que l'expression de l'APOF était réinduite après une chirurgie bariatrique favorisant une amélioration des caractéristiques histologiques de la NASH (**Figure 43C et D**). Ces données suggèrent donc que l'ApoF pourrait jouer un rôle dans le développement de la NAFLD et/ou de ses complications. Dans le contexte de la NAFLD, l'ApoF pourrait être une cible moléculaire entre la NAFLD et les maladies cardiovasculaires où la dyslipidémie constitue l'un des facteurs de risque majeur. L'objectif de cette dernière partie est donc de déterminer si l'ApoF joue un rôle causal dans le développement de la NAFLD ou si la diminution de son expression est une conséquence de l'évolution de l'état du foie.

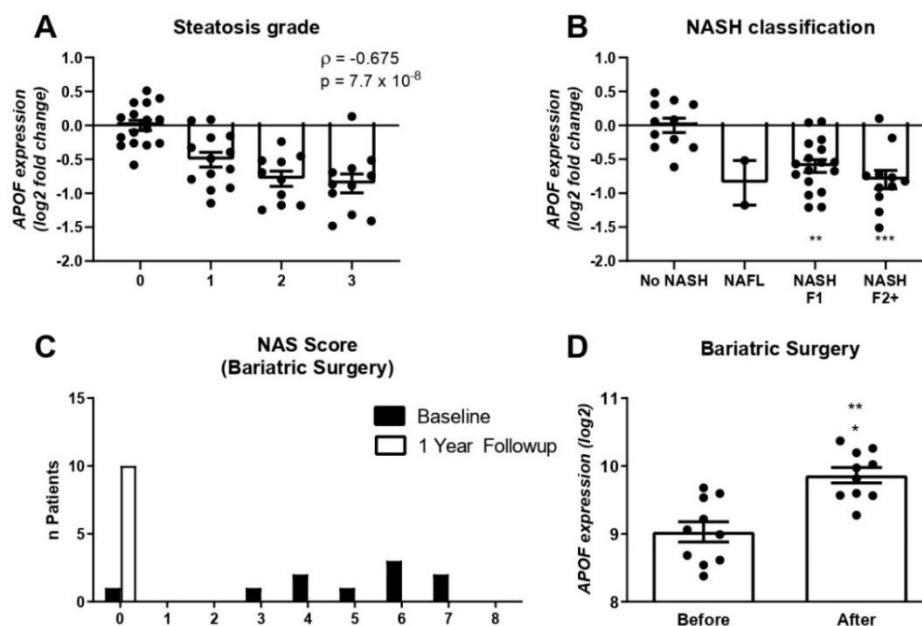


Figure 43 : L'expression de l'APOF est diminuée chez les patients atteints de NASH et restaurée après une chirurgie bariatrique. Expression normalisée de l'ARNm de l'APOF hépatique selon le grade de stéatose

(A) et selon la classification de la NASH (B) chez l'homme (n=50). Comparaison du score histologique NAS (C) et de l'expression de l'ARNm de l'APOF hépatique (D) avant et 1 an après la chirurgie bariatrique chez l'homme (n=10). ρ , coefficient de corrélation de spearman. Les données de (A) et (B) sont présentées sous forme de changement log2 par rapport au grade 0 et au groupe sans NASH \pm SEM.

2. Mise au point d'un modèle murin de NAFLD

Un des régimes classiquement utilisé pour induire la NASH est le régime déficient en méthionine et en choline (MCD). Bien qu'avec ce régime, les souris développent des lésions caractéristiques de la NASH, elles perdent plus de 20% de leur masse corporelle en 4 à 6 semaines et, par conséquent, deviennent plus sensibles à l'insuline²⁴⁵, un phénotype distinct du développement de la NAFLD chez l'homme qui survient classiquement dans un contexte de syndrome métabolique. De plus, ce type de régime bloque la sécrétion des VLDL et n'est donc pas adapté à l'étude du métabolisme des lipoprotéines. Il existe de nombreux autres modèles permettant d'induire la NASH mais de précédents résultats obtenus au laboratoire montrent que dans ces différents modèles tels que le régime riche en graisses (*high-fat diet*), le régime fructose ou les souris LDLR-KO, l'expression de l'ApoF est inchangée. C'est pourquoi nous avons choisi de développer un nouveau régime d'induction de la NASH dans lequel nous observons une diminution de l'expression de l'ApoF ainsi que les critères associés à la NAFLD comme chez l'homme tels qu'une obésité, une dyslipidémie et une insulinoresistance²²¹. Pour cela, des souris sauvages (WT) en fond C57BL6/J ont été nourries soit avec un régime standard (*Chow*), soit avec un régime riche en graisses et en sucres supplémenté en cholestérol (HFHS+chol). Après 24 semaines, chez les souris nourries avec le régime HFHS+chol, nous observons une diminution des concentrations plasmatiques de TG (**Figure 44A**) ainsi qu'une importante augmentation de la concentration en TC (**Figure 44B**) et des transaminases (**Figure 44C**), reflet de la souffrance hépatique. De plus, les concentrations hépatiques en TG et en cholestérol sont très fortement augmentées après 24 semaines de régime HFHS+chol (**Figure 44D et E**). Comme attendu, une diminution de 30% de l'expression hépatique de l'*ApoF* est observée chez les souris sous régime (**Figure 44F**). L'analyse histologique permet de confirmer la présence de signes caractéristiques de la NASH tel que la stéatose et la présence de foyers inflammatoires (**Figure 44G**). Ces données démontrent que notre modèle est capable d'induire la NASH, une hypercholestérolémie et diminue l'expression hépatique de l'*ApoF*.

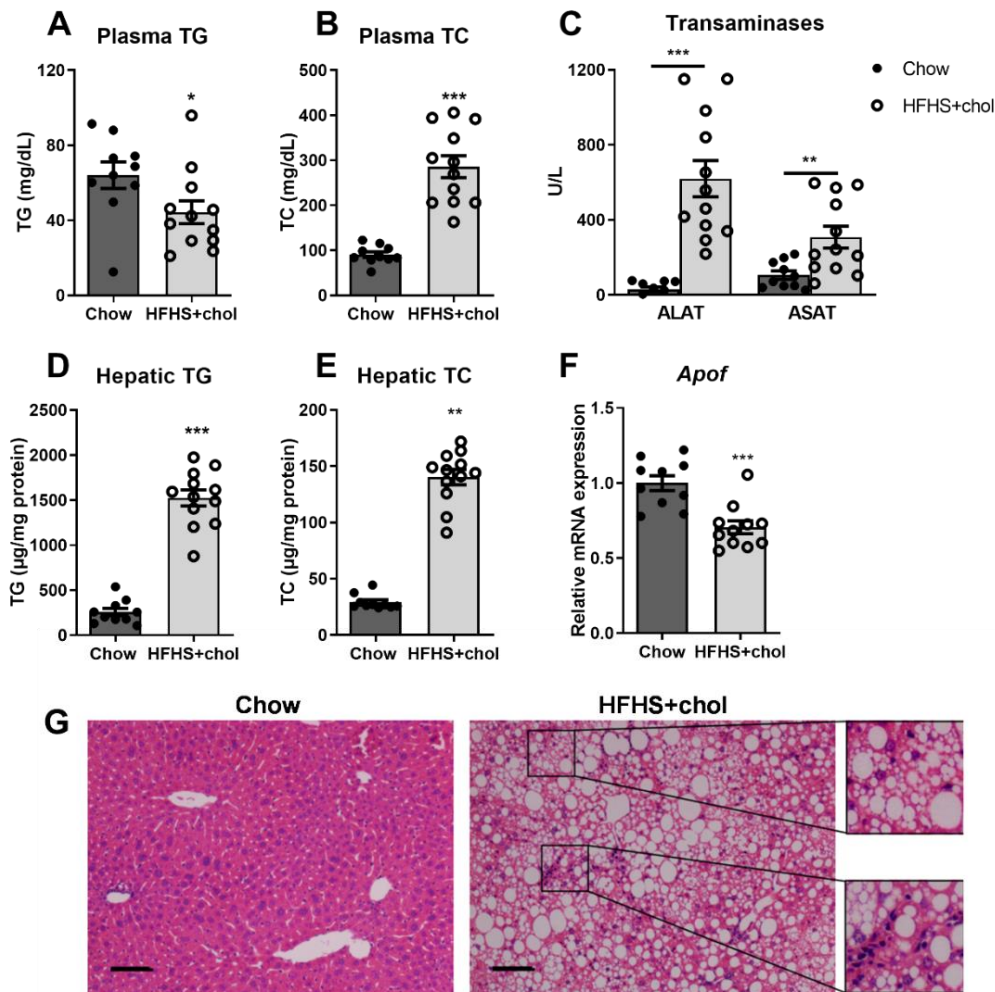


Figure 44 : Les souris nourries avec un régime HFHS+chol pendant 24 semaines développent une NASH, une hypercholestérolémie et ont une expression hépatique de l'Apof réduite. Concentration plasmatique des TG (A), du TC (B) et des transaminases ASAT et ALAT (C) chez les souris nourries avec un régime chow ou HFHS+chol pendant 24 semaines après 5 heures de jeûne (n=10-12 par groupe). (C) Concentration hépatique de TG (D) et de TC (E) chez les souris nourries avec un régime chow ou HFHS+chol pendant 24 semaines après 5 heures de jeûne (n=10-12 par groupe). (F) ARNm de l'Apof hépatique chez des souris nourries avec un régime chow ou HFHS+chol pendant 24 semaines après 5 heures de jeûne (n=10-12 par groupe). (G) Représentation histologique d'une coupe de foie colorée à l'hématoxyline-éosine d'une souris nourrie avec le régime chow et d'une souris nourrie avec le régime HFHS+chol, barre d'échelle : 100µM (adapté de Haas et al., 2019²²¹). *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 par rapport au contrôle par test t. Toutes les données sont présentées sous forme de moyennes ± SEM.

3. Etude de la surexpression de l'APOF dans un modèle murin de NAFLD

Des résultats avant et après une chirurgie bariatrique obtenus chez des patients atteints de NASH montrent une restauration de l'expression hépatique de l'APOF parallèlement à l'amélioration du score histologique de NASH (Figure 43C et D). Afin de déterminer si l'augmentation de l'expression de l'APOF est capable d'améliorer le statut du foie dans un contexte de NAFLD, des souris sauvages ont été nourries avec le régime HFHS+chol pendant 10 semaines puis ont reçu une injection de l'Ad-hApoF afin d'augmenter l'expression hépatique de l'APOF. Les souris contrôles ont été injectées avec l'Ad-GFP.

Après l'injection des adénovirus, nous mesurons une expression abondante de l'ARNm de l'*APOF* dans le foie (**Figure 45A**) et observons l'apparition de la protéine ApoF humaine dans le plasma des souris injectées avec l'Ad-hApoF (**Figure 45B**). Après 4 jours, nous n'observons pas de modifications des concentrations plasmatiques de TG et de TC (**Figure 45C et D**). Toutefois, une augmentation significative des concentrations de TG est mesurée 7 jours après l'injection chez les souris surexprimant l'*APOF* (**Figure 45C**). Étonnamment, la surexpression de l'*APOF* favorise l'augmentation des TG dans les lipoprotéines de type VLDL et LDL (**Figure 45E**). Bien que la concentration plasmatique de TC soit identique entre les souris Ad-GFP et Ad-hApoF 7 jours après l'injection (**Figure 45D**), nous observons une diminution du cholestérol contenu dans les HDL au profit d'une augmentation du cholestérol dans les LDL chez les souris Ad-hApoF (**Figure 45F**). Les concentrations plasmatiques de l'ApoB et de l'ApoA1 confirment ces résultats. En effet, chez les souris Ad-hApoF, la concentration de l'ApoB, liée aux lipoprotéines de basse densité, est augmentée et, à l'inverse, celle de l'ApoA1, apolipoprotéine majoritaire des HDL, est diminuée (**Figure 45H**). Ces résultats suggèrent que la surexpression de l'*APOF* chez les souris nourries avec le régime HFHS+chol pendant 10 semaines favorise l'augmentation du nombre de particules LDL dans le plasma et diminue la quantité de particules HDL. La surexpression de l'*APOF* favorise donc la présence d'un profil lipoprotéique délétère du point de vue cardiovasculaire.

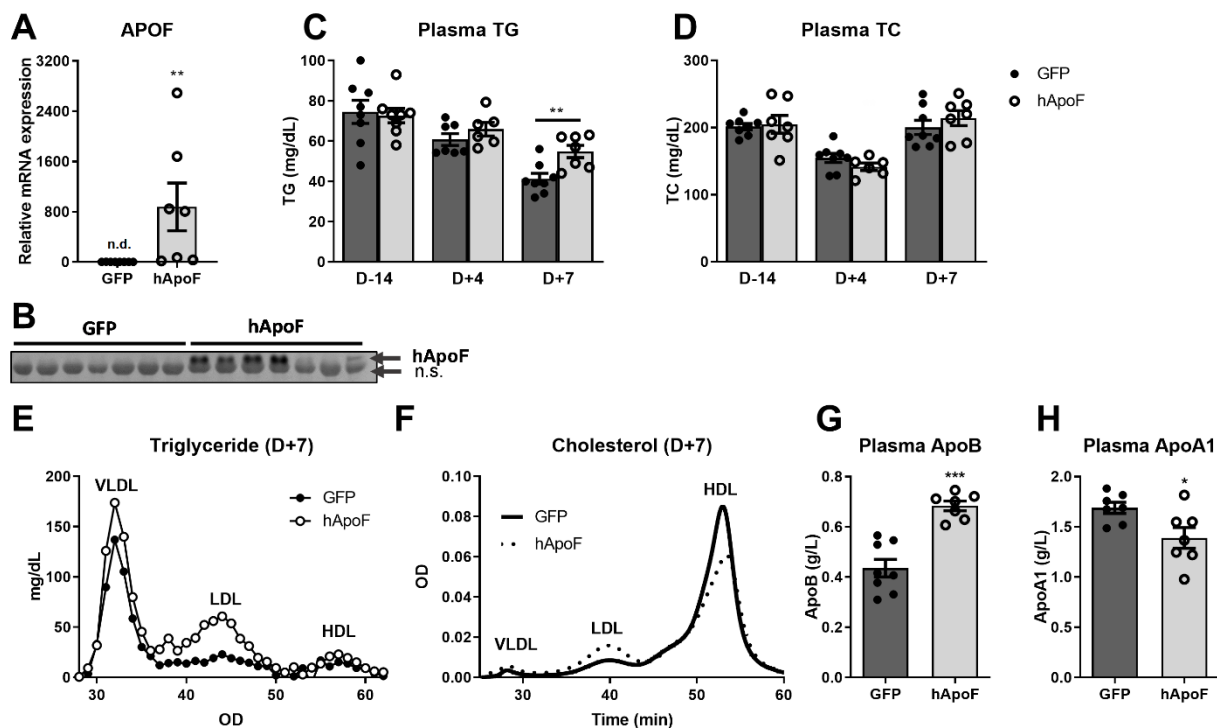


Figure 45 : La surexpression de l'*APOF* dans un modèle murin de NAFLD favorise l'accumulation de LDL et la diminution de HDL dans le plasma. (A) ARNm de l'*APOF* hépatique chez des souris Ad-GFP et Ad-hApoF nourries avec un régime HFHS+chol pendant 10 semaines après 5 heures de jeûne ($n=8$ par groupe). (B)

Western blot de l'ApoF humaine dans le plasma chez les souris Ad-GFP ou Ad-hApoF nourries avec un régime HFHS+chol pendant 10 semaines après 5 heures de jeûne (n=7 par groupe). Concentrations plasmatiques de TG (C) et de TC (D) chez des souris nourries avec un régime HFHS+chol pendant 10 semaines 14 jours avant, 4 et 7 jours après l'injection des Ad-GFP et Ad-hApoF après 5 heures de jeûne (n=8 par groupe). Mesure des TG (E) et du cholestérol (F) plasmatiques dans les différentes fractions lipoprotéiques après séparation par FPLC chez des souris Ad-GFP ou Ad-hApoF nourries avec un régime HFHS+chol pendant 10 semaines après 5 heures de jeûne (n=2-3 pool de 2-3 souris par groupe). Concentration plasmatique de l'ApoB (G) et de l'ApoA1 (H) chez des souris Ad-GFP ou Ad-hApoF nourries avec un régime HFHS+chol pendant 10 semaines après 5 heures de jeûne (n=7-8 par groupe). *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 par rapport au contrôle par test t. Toutes les données sont présentées sous forme de moyennes ± SEM.

Nous avons ensuite cherché à déterminer si les modifications des concentrations plasmatiques de lipides observées chez ces souris sont le reflet de changements dans le métabolisme hépatique des lipides. Bien que nous n'observons pas de différences significatives des concentrations hépatiques de TG et de TC avec la surexpression de l'APOF (**Figure 46A et B**), l'expression de *Ldlr* et de *Lrp1* sont diminuées respectivement de 30 et 45% et l'expression de *Idol* tend à être augmentée chez les souris Ad-hApoF (**Figure 46C**). Cela suggère que la quantité des récepteurs LDLR et LRP1 dans les hépatocytes est diminuée chez les souris Ad-hApoF et pourrait contribuer à la diminution de la capture des LDL plasmatiques.

De plus, nous observons une tendance à la diminution de l'expression du récepteur *Sr-b1* (**Figure 46C**) suggérant une diminution de la capture des HDL et donc une diminution de l'élimination du cholestérol. Afin d'estimer si l'excrétion du cholestérol est affectée par la surexpression de l'APOF, l'expression de différents gènes impliqués dans le métabolisme des acides biliaires ont été analysés. Nous observons, d'une part, une forte diminution de l'expression de gènes impliqués dans la formation des acides biliaires comme *Fxr*, *Cyp7a1*, *Cyp8b1* et *Cyp27a1* (**Figure 46D**). L'expression des transporteurs *Abcg5* et *Abcg8*, impliqués dans le transport du cholestérol du foie vers la bile, est, d'autre part, également diminuée. Malgré l'absence de différences dans les concentrations hépatiques de cholestérol, ces résultats suggèrent que la surexpression de l'APOF pourrait diminuer le transport inverse du cholestérol.

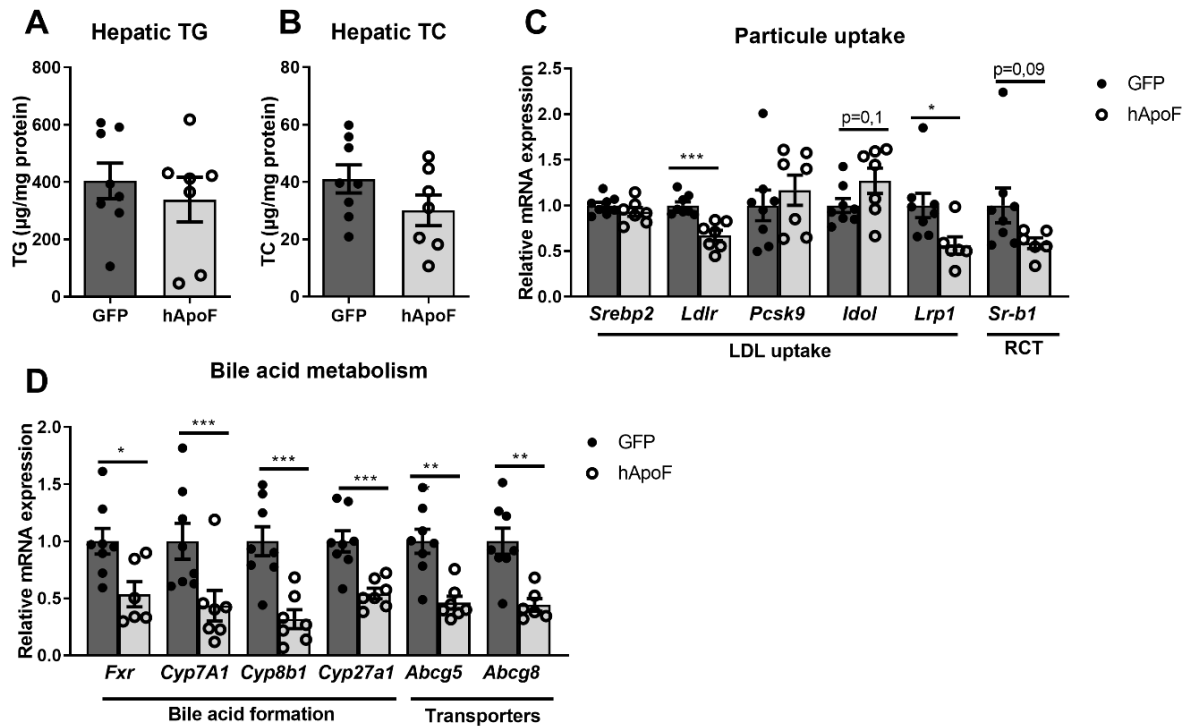


Figure 46 : La surexpression de l'APOF diminue l'expression des récepteurs aux LDL et diminue l'expression de gènes impliqués dans l'élimination du cholestérol dans la bile. Concentrations hépatiques de TG (A) et de TC (B) chez des souris Ad-GFP et Ad-hApoF nourries avec un régime HFHS+chol pendant 10 semaines après 5 heures de jeûne ($n=8$ par groupe). ARNm de gènes impliqués dans la capture des particules (C) et du métabolisme des acides biliaires (D) chez des souris Ad-GFP et Ad-hApoF nourries avec un régime HFHS+chol pendant 10 semaines après 5 heures de jeûne ($n=7-8$ par groupe). * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$ par rapport au contrôle par test t. Toutes les données sont présentées sous forme de moyennes \pm SEM.

Sachant que la dérégulation du métabolisme du cholestérol intracellulaire est associée à la sévérité de la NASH chez l'homme¹⁴⁵, si l'ApoF favorise effectivement le stockage de cholestérol dans le foie alors sa surexpression agit comme un facteur aggravant de la pathologie. Afin d'évaluer la souffrance hépatique dans notre étude, nous avons quantifié les transaminases plasmatiques. Quatre jours après l'injection, les concentrations d'ASAT et d'ALAT sont comparables à celles observées avant l'injection des adénovirus (**Figure 47A et B**). Toutefois, au jour 7, les concentrations de transaminases sont fortement augmentées dans les deux groupes et cette augmentation est plus marquée chez les souris Ad-hApoF (**Figure 47A et B**). De plus, l'expression hépatique de différents gènes inflammatoires est augmentée chez les souris Ad-hApoF. En effet, les expressions de *Ccr2* et *F4/80*, reflétant respectivement le recrutement et la quantité de cellules myéloïdes dans le foie, sont augmentées ainsi que *Gzmb* et *Prf1*, deux marqueurs des lymphocytes T CD8+ décrit comme une population immunitaire importante dans le développement de la NASH²²¹ (**Figure 47C**). L'analyse histologique du foie révèle un plus grand nombre de foyers inflammatoires chez les souris Ad-hApoF par rapport aux souris contrôles (Ad-GFP) suggérant, à nouveau, une augmentation de l'inflammation chez les souris surexprimant

l'APOF (**Figure 47D**). De manière intéressante, bien que le contenu en TG hépatiques ne soit pas différent entre les souris Ad-GFP et Ad-hApoF (**Figure 46A**), il apparaît que les gouttelettes lipidiques sont plus petites dans les foies des souris Ad-hApoF que chez les souris Ad-GFP (**Figure 47D**). Pour conclure, ces résultats suggèrent que la surexpression de l'APOF serait plutôt défavorable dans le contexte de NASH puis qu'elle aggrave l'inflammation et conduit à un profil lipoprotéique délétère pour l'organisme. La fluorescence liée à la GFP sur des coupes histologiques est plus intense dans le groupe Ad-hApoF que dans le groupe Ad-GFP (**Figure 45E**). Cela suggère que les doses de virus injectées ne sont peut-être pas équivalentes et peuvent influencer différemment l'état inflammatoire du foie. Il sera donc indispensable de reproduire ces expériences afin de pouvoir conclure sur le rôle de l'ApoF dans l'amélioration du statut du foie en contexte de NASH.

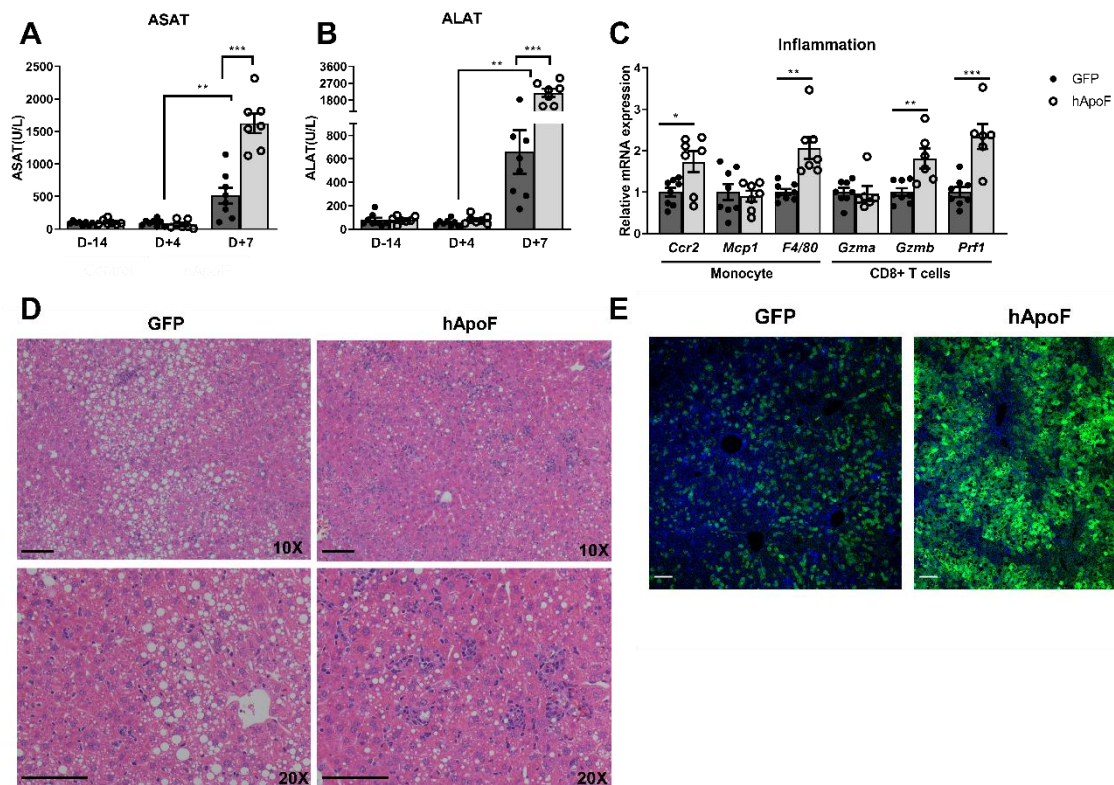


Figure 47 : La surexpression de l'APOF augmente la souffrance hépatique et induit une inflammation dans un modèle pathologique de NAFLD. Concentration plasmatique d'ASAT (A) et d'ALAT (B) chez des souris nourries avec un régime HFHS+chol pendant 10 semaines 14 jours avant, 4 et 7 jours après l'injection des Ad-GFP et Ad-hApoF après 5 heures de jeûne (n=8 par groupe). (C) ARNm de gènes impliqués dans l'inflammation chez des souris Ad-GFP et Ad-hApoF nourries avec un régime HFHS+chol pendant 10 semaines après 5 heures de jeûne (n=7-8 par groupe). (D) Représentation histologique d'une coupe de foie colorée à l'hématoxyline-éosine d'une souris Ad-GFP et d'une souris Ad-hApoF nourries avec le régime HFHS+chol, barre d'échelle : 100µM. (E) Image de microscopie confocale d'une coupe de foie dont les noyaux ont été marqués au Hoechst d'une souris Ad-GFP et d'une souris Ad-hApoF nourries avec le régime HFHS+chol, barre d'échelle : 100µM. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 par rapport au contrôle par test t. Toutes les données sont présentées sous forme de moyennes ± SEM.

4. Influence de la déficience totale de l'ApoF sur le développement de la NAFLD

Dans la NASH, l'expression de l'ApoF est diminuée dans la NASH (**Figure 23B**). Toutefois, nous ne savons pas si cette diminution est la cause du développement de la NAFLD ou si elle est une conséquence de la modification de l'état du foie. Afin de déterminer si le développement de la maladie est accéléré lorsque l'ApoF est absente, des souris ApoF-KO ont été nourries avec un régime HFHS+chol pendant 20 semaines afin d'analyser l'influence de la délétion de l'ApoF sur le développement de la NAFLD. De manière surprenante, la prise de poids est plus importante dès la 9^{ème} semaine de régime chez les souris ApoF-KO par rapport aux souris contrôles. Après 20 semaines de régime, les souris ApoF-KO ont un poids corporel augmenté de 10% par rapport aux souris contrôles (**Figure 48A**). Les souris ApoF-KO semblent de plus avoir une glycémie à jeun plus élevée que les souris contrôles bien que cette différence ne soit pas observée tout au long du régime (**Figure 48C**). Les concentrations plasmatiques d'ALAT à 10 et 16 semaines sont basses et ne présentent aucune différence entre les deux groupes (**Figure 48B**) suggérant qu'il n'y a pas de lésions hépatiques importante à ce stade. Concernant les lipides plasmatiques, le régime engendre une diminution des concentrations de TG dès 3 semaines de régime dans les 2 groupes de souris (**Figure 48D**). Bien que les concentrations de TG soient similaires entre les 2 groupes de souris, l'analyse par FPLC des TG contenus dans les différentes lipoprotéines révèle une augmentation des TG contenus dans les particules VLDL chez les souris ApoF-KO dès 3 semaines de régime (**Figure 48E**). Une augmentation significative des concentrations plasmatiques de TG n'est mesurable qu'à partir de 16 semaines de régime (**Figure 48D**). D'autre part, la concentration plasmatique de TC augmente dès le début du régime mais de façon plus importante chez les souris ApoF-KO (**Figure 48F**) et de façon similaire dans toutes les fractions à la semaine 3 (**Figure 48G**). Ces résultats suggèrent donc que les souris ApoF-KO nourries avec le régime HFHS+chol présentent une dérégulation du métabolisme du glucose et des lipides plus importante que les souris contrôles aboutissant à une augmentation de la glycémie à jeun et une augmentation des TG et TC plasmatiques mais aussi une augmentation du poids corporel, des comorbidités des NAFLD.

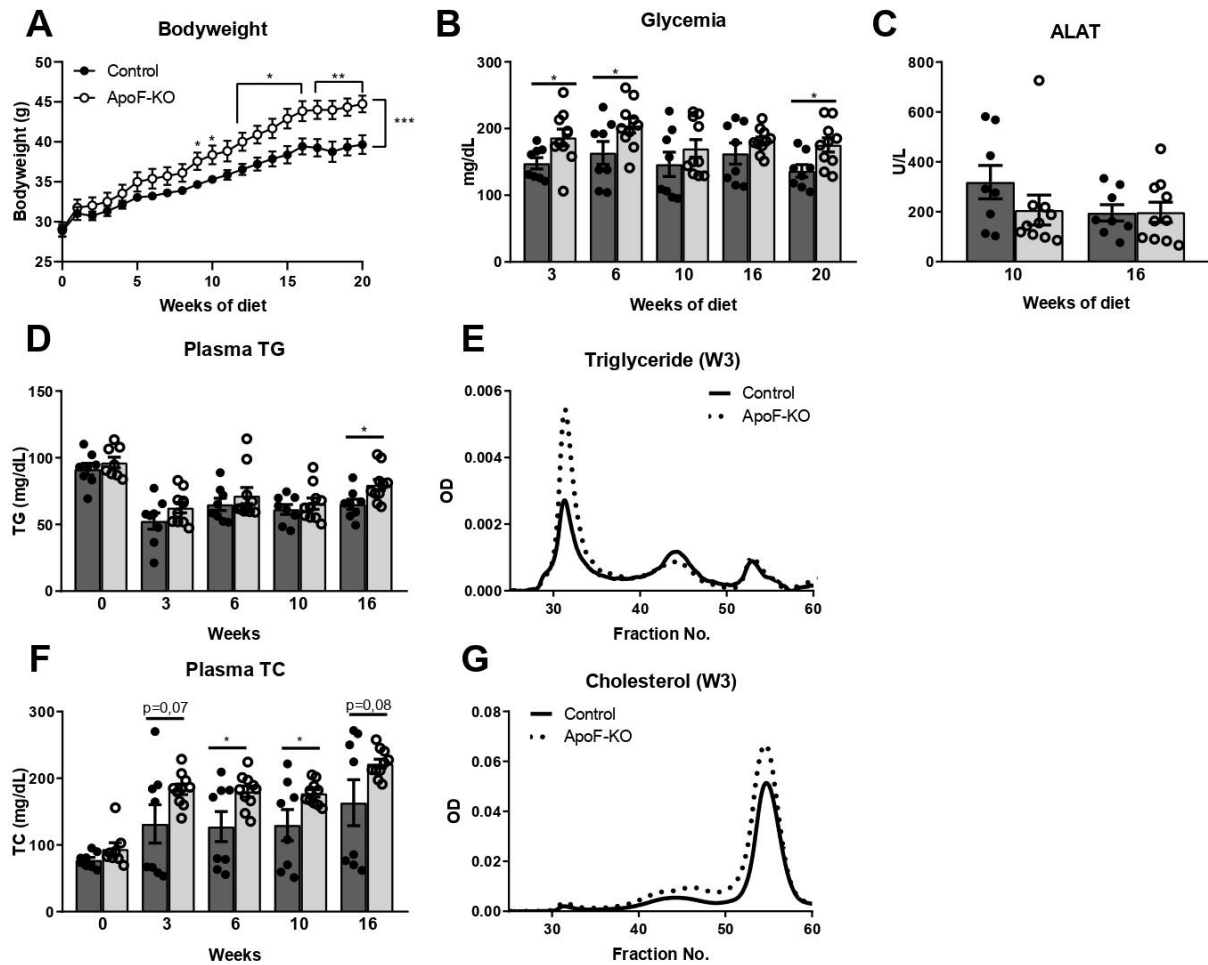


Figure 48 : La déficience totale de l'ApoF favorise une augmentation du poids corporel, de la glycémie et du cholestérol plasmatique chez les souris nourries avec le régime HFHS+chol. (A) Mesure hebdomadaire du poids corporel chez les souris contrôles et ApoF-KO pendant 20 semaines de régime HFHS+chol (n=8-10 par groupe). Concentration plasmatique du glucose (B) de l'ALAT (C), des TG (D) et TC plasmatique (F) au cours des 20 semaines de régime HFHS+chol chez des souris contrôles et ApoF-KO après 5 heures de jeûne (n=8-10 par groupe). Mesure des TG (E) et du cholestérol (G) plasmatiques dans les différentes fractions lipoprotéiques après séparation par FPLC chez des souris contrôles ou ApoF-KO nourries avec un régime HFHS+chol pendant 3 semaines après 5 heures de jeûne (n=1 pool par groupe). *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 par rapport au contrôle par test t ou ANOVA à deux voies pour (A). Les comparaisons multiples ont été évaluées par le test post-hoc LSD de Fisher pour (A) Toutes les données sont présentées sous forme de moyennes ± SEM.

Malheureusement, à ce stade de l'étude, nous n'avons pas encore évalué l'influence de la délétion de l'ApoF sur le développement de la NASH en histologie. Toutefois, après 20 semaines de régime, les poids du foie et du tissu adipeux inguinal (iWAT) ne sont pas différents entre les deux groupes (**Figure 49A et B**). Seul le poids du tissu adipeux gonadique (gWAT) est plus élevé chez les souris ApoF-KO que chez les souris contrôles (**Figure 49C**). Ces résultats suggèrent que la délétion de l'ApoF favorise le stockage des lipides dans le tissu adipeux viscéral, décrit comme présentant un risque plus important dans le développement du diabète et des événements cardiovasculaires²⁴⁶. De manière globale, ces éléments suggèrent que la délétion de l'ApoF est délétère du point de vue

cardiovasculaire. Toutefois, nous ne sommes pas en mesure de conclure sur son impact dans le foie.

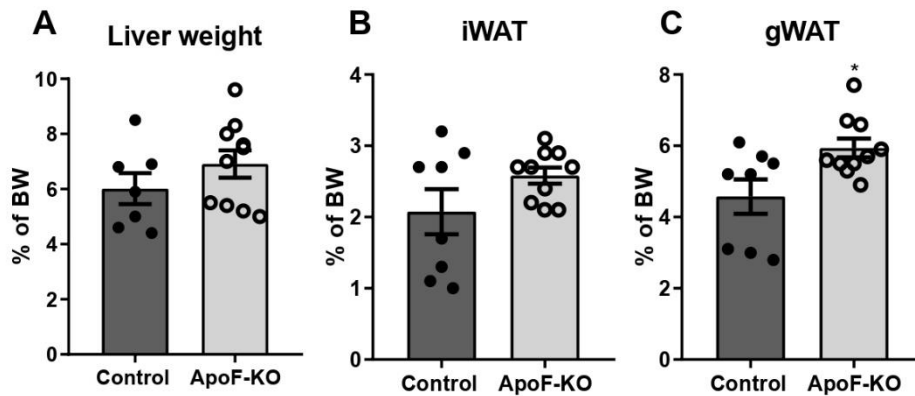


Figure 49 : La déficience de l'ApoF est associée à une augmentation du poids du tissu adipeux viscéral lors d'un régime HFHS+chol. Mesure du poids du foie (A), du tissu adipeux inguinal (B) et du tissu adipeux gonadique (C) chez des souris contrôles ou ApoF-KO nourries avec un régime HFHS+chol pendant 20 semaines après 5 heures de jeûne ($n=8-10$ par groupe). * $p<0,05$ par rapport au contrôle par test t. Toutes les données sont présentées sous forme de moyennes \pm SEM.

Conclusion de la seconde partie

Dans cette deuxième partie, nous montrons que l'expression de l'*APOF* est inversement corrélée au grade de stéatose, ainsi, elle diminue dans les foies des patients atteints de NASH et elle est restaurée après une chirurgie bariatrique. Ces résultats ont identifié l'ApoF comme un acteur potentiellement impliqué dans le développement de la NAFLD. L'objectif de cette dernière partie était de savoir si l'ApoF joue un rôle causal dans le développement de la NAFLD ou si sa diminution est une conséquence de l'évolution de l'état du foie. Contrairement à ce que les résultats de la première partie laissaient supposer, l'augmentation de l'expression de l'*APOF* ne semble pas protectrice contre le développement de la NAFLD puisque l'on observe une aggravation de l'inflammation hépatique. De la même manière, la délétion totale de l'ApoF ne semble pas accélérer le développement de la pathologie mais, au contraire, pourrait jouer un rôle protecteur bien que nous ne l'ayons pas encore vérifié. Ainsi, ces résultats suggèrent que la diminution de l'expression de l'*APOF* hépatique chez les patients atteints de NAFLD pourrait être un mécanisme compensatoire visant à empêcher un effet délétère de l'ApoF. Toutefois, des études complémentaires sont indispensables pour confirmer le rôle de l'ApoF dans le développement de la NAFLD

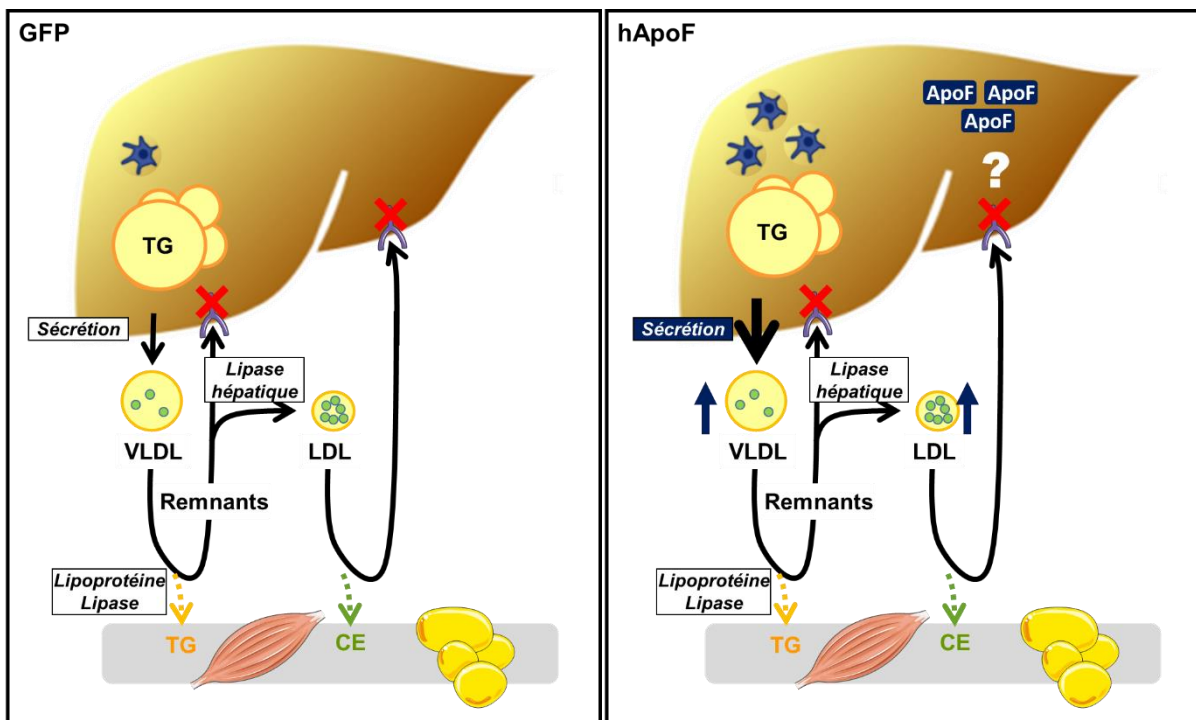


Figure 50 : Résumé des résultats de la partie 2.

Discussion

1. Différences entre effets aigus et chroniques de l'ApoF dans le contrôle du métabolisme lipidique

Dans la circulation, l'ApoF est un composant mineur des particules LDL et, surtout, HDL^{185,198}. Elle a d'abord été décrite comme un inhibiteur de la CETP^{198,202} bien que cela n'ait été reproduit que dans des contextes très spécifiques¹⁸⁵. L'absence de CETP chez le rongeur¹⁸ suggère que l'ApoF puisse avoir d'autres fonctions. Des études fonctionnelles ont en effet montré que la surexpression chronique de l'APOF réduit les concentrations plasmatiques en cholestérol et celle du HDL-C chez la souris. Il est de plus montré que la surexpression de l'APOF favorise le transport inverse du cholestérol en augmentant la capacité d'efflux de cholestérol par les particules HDL¹⁸⁵. Dans notre étude, nous avons constaté qu'après 4 jours de surexpression de l'APOF chez la souris sauvage (C57Bl6/J WT), les concentrations plasmatiques de TG sont diminuées (**Figure 25B**), probablement grâce à une meilleure clairance des *remnants* par leurs récepteurs. Contrairement aux résultats de Lagor¹⁸⁵, aucune modulation du TC ni des HDL-C n'est observé dans notre étude (**Figure 25A et C**). Les discordances observées peuvent résulter des différentes conditions expérimentales en terme de durée (4 jours de surexpression vs chronique) et d'amplitude d'expression de l'ApoF (1,5 à 2 fois vs 25 fois). En effet, lors d'une surexpression de l'APOF de plus longue durée (7 jours), nous observons une diminution des concentrations plasmatiques d'HDL-C chez des souris nourries avec un régime riche en cholestérol (**Figure 45D**). Toutefois, cette diminution semble être la conséquence d'un mécanisme différent de celui observé par Lagor et al¹⁸⁵. En effet, la diminution de l'expression hépatique du récepteur *Sr-b1* dans notre étude (**Figure 46C**) suggère une diminution de la capture des HDL par le foie. En revanche, la surexpression chronique de l'APOF n'a montré aucune différence d'expression en ARNm et en protéines de SR-B1¹⁸⁵. Il serait intéressant, dans notre étude, d'évaluer l'influence de la surexpression aiguë de l'APOF sur le transfert inverse du cholestérol.

Malgré leurs différences, ces deux études montrent que la surexpression de l'APOF, dans un contexte physiologique, joue un rôle protecteur du point de vue cardiovasculaire puisqu'elle favorise l'élimination du cholestérol plasmatique.

2. Rôle de l'ApoF dans la sécrétion des VLDL

Au cours de ce projet, nous avons étudié l'influence de la modulation de l'expression de l'APOF sur le métabolisme des lipides chez la souris sauvage (C57Bl6/J WT). Dans un premier temps, nous avons observé que la surexpression de l'APOF favorise la sécrétion de VLDL et, par conséquent, augmente la délivrance des TG vers les tissus périphériques. Toutefois, alors que la réduction partielle de l'expression de l'ApoF diminue la sécrétion des VLDL, la délétion totale de l'ApoF ne semble pas affecter ce processus. Il est possible que la délétion totale et chronique de l'ApoF favorise des mécanismes compensatoires pour pallier à la diminution de sécrétion des VLDL en l'absence de l'ApoF.

Plusieurs mécanismes peuvent expliquer le rôle de l'ApoF sur la modulation de la sécrétion des VLDL. Dans nos expériences, l'injection de P407 nous permet de mesurer la quantité totale de TG sécrétés mais ne permet pas de distinguer si nous observons une diminution du nombre ou de la taille des VLDL. L'ApoF pourrait donc jouer un rôle à différentes étapes de la sécrétion de ces particules. La taille des VLDL pourrait être altérée par la modification de leur composition lipidique ou protéique via, par exemple, une perturbation de la disponibilité des précurseurs lipidiques ou de la traduction de l'ApoB. D'autre part, l'ApoF pourrait modifier le taux de production de VLDL en modifiant l'activité d'une des enzymes impliquées dans leur synthèse comme DGAT ou MTP. Il est également possible que la modulation de la sécrétion des VLDL provienne d'un effet extra-hépatique comme par exemple la diminution ou l'augmentation du retour des acides gras libres vers le foie. En effet, une étude a montré que l'ApoF pourrait également modifier l'activité des tissus périphériques comme le tissu adipeux brun dans lequel elle est capable de stimuler la thermogénèse²⁰⁴. Toutefois, nous n'avons pas observé de modifications importantes des concentrations plasmatiques d'acides gras libres au cours de nos expériences (données non présentées). Nous pouvons dès à présent supposer que le rôle de l'ApoF est, en partie, de modifier la composition des VLDL. En effet, de précédentes études du laboratoire ont montré que l'utilisation d'un siApoF *in vitro* réduit les taux de synthèse de la phosphatidylcholine (PC) dans les cellules IHH (données non présentées). La PC, ainsi que la phosphatidyléthanolamine (PE), sont les principaux composants phospholipidiques qui forment la monocouche de surface des particules VLDL. Plusieurs études ont montré que la PC est cruciale pour l'assemblage et la sécrétion des ces particules²⁴⁷. La diminution des niveaux de PE peut également réduire la sécrétion des VLDL car ~30% de la production hépatique de PC provient de la conversion de PE en PC par la phosphatidyléthanolamine N-méthyltransférase (PEMT)²⁴⁸. L'ApoF pourrait donc moduler la sécrétion des VLDL par le foie en régulant la biosynthèse ou la dégradation de la PC.

De manière intéressante, une diminution du rapport PC/PE²⁴⁹ et des niveaux plus faibles de PEMT²⁵⁰ ont été observés chez les patients atteints de NASH. De plus, les régimes qui réduisent la disponibilité de la PC, comme le régime MCD, réduisent la sécrétion hépatique de VLDL-TG et sont couramment utilisés pour induire les caractéristiques de la NAFLD chez la souris. Des études *in vivo* indiquent, qu'en plus de la stéatose, la réduction de la disponibilité de la PC peut également contribuer aux lésions hépatiques dans la NASH. Par exemple, les souris déficientes en PEMT nourries avec un régime riche en graisses développent une inflammation et une fibrose hépatique plus sévère, probablement en raison du développement d'une cholestase²⁵¹. La PC est, de plus, un précurseur majeur de la formation de TG dans le foie²⁵². Ainsi, les souris déficientes pour la phospholipase D1, enzyme permettant l'hydrolyse de la PC, sont plus sensibles au développement de la NASH²⁵³. La PC est également impliquée dans la régulation de la taille des gouttelettes lipidiques²⁵⁴. Il est montré que l'inactivation des enzymes des voies de biosynthèse de la PC conduit à la formation de gouttelettes lipidiques de très grosses tailles. En effet, grâce à ses propriétés biophysiques, la PC empêche la fusion des gouttelettes lipidiques. La diminution de la PC pourrait donc être responsable du passage de la microstéatose vers la macrostéatose observé dans la NASH⁸².

Dans le contexte de la NAFLD, la diminution d'expression de l'ApoF pourrait donc être à l'origine d'une altération du métabolisme de la PC provoquant une diminution de la sécrétion des VLDL et une augmentation du stockage des TG dans le foie (**Figure 51**). Pour compléter ces résultats, il serait intéressant de déterminer l'influence de l'ApoF dans ce mécanisme par la mesure de l'incorporation de choline ou de méthionine radiomarqués dans les lipides (PC, TG) lorsque l'expression hépatique de l'ApoF est modifiée.

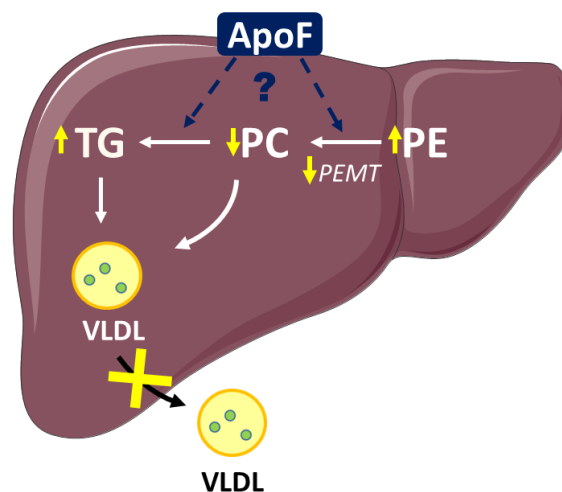


Figure 51 : La dérégulation du métabolisme de la PC favorise le développement de la NAFLD.

3. Rôle de l'ApoF dans la clairance des *remnants*

3.1. L'ApoF favorise l'endocytose des *remnants* ?

Nous avons montré que la surexpression de l'APOF augmente la clairance des *remnants* par une augmentation de leur capture dans le foie. Les *remnants* de chylomicrons et de VLDL ainsi que les LDL peuvent être captés par le foie principalement par les récepteurs LDLR et LRP1, mais aussi par l'action des HSPG le plus souvent grâce à leur liaison avec l'ApoE ou l'ApoB100^{23,33}. Nous avons montré que la surexpression de l'APOF augmente l'expression des gènes impliqués dans la capture des particules comme LDLR, mais aussi PCSK9 et IDOL, qui empêchent son recyclage à la membrane^{29,30}, et LRP1 (**Figure 34**). Alors que la quantité totale de LRP1 et de syndecan-1 est augmentée dans les foies des souris Ad-hApoF, nous observons une diminution de la quantité de LDLR à la membrane des hépatocytes indiquant une diminution de son recyclage (**Figure 36B et D**). Toutefois, la quantité totale de LDLR est identique entre les foies de souris Ad-GFP et Ad-hApoF. Etant donné la rapidité du mécanisme d'endocytose du LDLR (demi-vie : 2-4 min)²⁵⁵, ces résultats suggèrent que la surexpression de l'APOF conduit à l'augmentation de l'endocytose des *remnants* par LDLR et LRP1 (**Figure 36E**). En effet, la surexpression de l'APOF montre une augmentation du cholestérol dans le foie lors de l'injection de particules VLDL dont le cholestérol est marqué au [¹⁴C] (**Figure 32C**). De manière similaire, Lagor et al. mesure une accumulation de cholestérol marqué au [³H] dans le foie lors d'expériences du transport inverse du cholestérol¹⁸⁵.

De manière intéressante, nous observons une augmentation de l'expression des gènes cibles de SREBP2 chez les souris Ad-hApoF (**Figure 34**). En fonction du type de particules (*remnants* de chylomicrons ou LDL), le cholestérol apporté à la cellule après la capture des lipoprotéines peut être métabolisé selon deux voies différentes : il peut soit être stocké dans l'hépatocyte, soit être directement re-sécrété dans les VLDL²⁵. Dans cette seconde option, le cholestérol n'est pas intégré au stock intracellulaire et ne contribue donc pas à la répression de SREBP2. L'orientation vers l'une ou l'autre de ces voies est modulée par les enzymes ACAT, qui assurent l'estérification du cholestérol. L'estérification par ACAT1 favorise le stockage du cholestérol dans la cellule alors que l'estérification par ACAT2 contribue à la sécrétion du cholestérol dans les VLDL²⁵. Puisque nous observons une augmentation de la sécrétion de VLDL lors d'une surexpression de l'APOF (**Figure 26A**), nous pouvons supposer que l'ApoF favorise la sécrétion du cholestérol, provenant des *remnants*, dans les VLDL. L'utilisation d'inhibiteurs spécifiques de l'ACAT1²⁵⁶ ou de l'ACAT2²⁵⁷ chez les souris Ad-hApoF pourrait permettre d'estimer la contribution de chacune de ces isoformes dans la clairance des *remnants* par l'ApoF. Pour compléter ces résultats, il serait également

intéressant d'estimer si la capture des *remnants* par le foie est diminuée chez les souris Ad-shApoF ou ApoF-KO comme suggéré par nos expériences *in vitro* (**Figure 37**).

Puisque nous avons montré que l'ApoF permet de diminuer la concentration plasmatique de TG en augmentant la clairance des *remnants*, nous avons ensuite étudié l'effet de la surexpression de l'APOF dans un modèle murin de dyslipidémie. Pour cela, nous avons choisi d'utiliser le modèle de souris APOE2-KI qui expriment l'APOE2 humaine au lieu de l'ApoE murine. Cette isoforme possède une affinité fortement réduite pour le LDLR (1 à 2% d'affinité par rapport à l'isoforme APOE3)²⁴³, et dans une moindre mesure pour LRP1 (40% d'affinité par rapport à l'isoforme APOE3)²⁵⁸. De plus, plusieurs études ont montré que l'APOE2 inhibe la lipolyse des VLDL-TG^{259,260}. L'association de ces deux phénomènes induit une réduction importante de la clairance des *remnants* de VLDL et favorise alors le développement d'une hypertriglycéridémie et d'une hypercholestérolémie chez les souris APOE2-KI^{242,261}. De manière surprenante, nous avons observé que la surexpression de l'APOF dans ce modèle n'est plus capable de diminuer la concentration de TG mais, au contraire, augmente celle du LDL-C dans le plasma (**Figure 38A et E**). Plusieurs hypothèses peuvent expliquer ces résultats (**Figure 52**). Il est montré que l'injection d'un adénovirus exprimant la protéine RAP, qui entre en compétition avec les ligands de LRP1 comme les *remnants*, chez des souris transgéniques pour l'APOE*2 dans un fond génétique déficient pour l'ApoE aggrave fortement l'hypertriglycéridémie et l'hypercholestérolémie²⁶². Cela suggère que, malgré la diminution de l'affinité de l'APOE2 avec LRP1, une grande majorité de la clairance des *remnants* est assurée par LRP1 chez les souris APOE2-KI. Si le mécanisme d'action de l'ApoF requiert l'intervention de LRP1, il est possible que les capacités acceptrices de ces récepteurs soient saturées chez les souris APOE2-KI. Dans ce cas, la surexpression de l'APOF ne serait pas capable d'augmenter davantage la capture des *remnants* par LRP1. Ensuite, il se peut que l'ApoF module la capture des particules par une voie dépendante d'une ApoE fonctionnelle qui pourrait, dans ce modèle, être perturbé en présence de l'APOE2. Dans ce cas, l'augmentation de LDL-C chez ces souris pourrait être la conséquence d'une augmentation de la production de VLDL liée à la surexpression de l'APOF. L'excédent de *remnants* de VLDL produits ne pouvant être éliminé, ceux-ci seraient alors convertis en LDL. Toutefois, des expériences complémentaires sont nécessaires afin de déterminer précisément les raisons de cette accumulation de LDL chez les souris APOE2-KI surexprimant l'APOF.

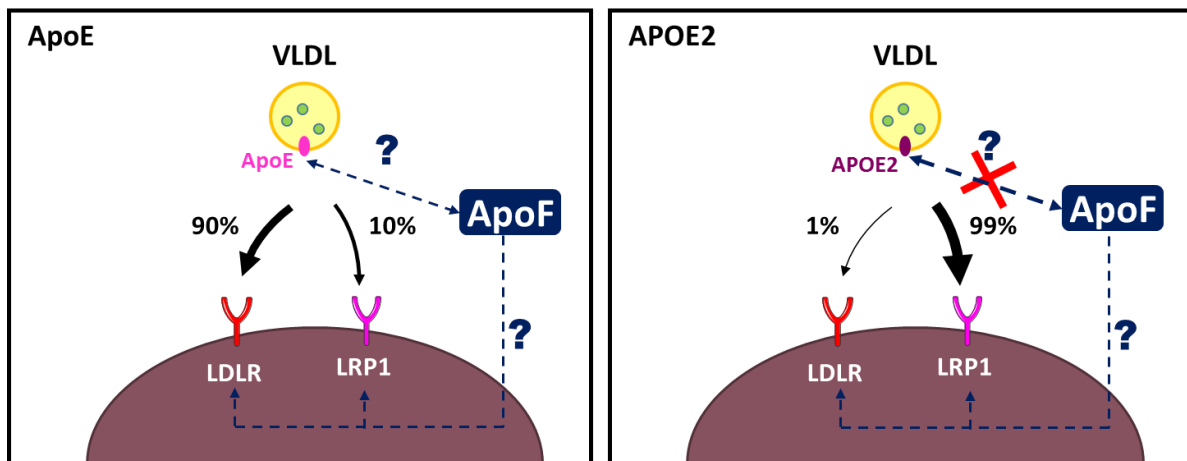


Figure 52 : Hypothèses concernant l'impact de la surexpression de l'APOF chez les souris APOE2-KI. L'ApoF pourrait favoriser la capture des VLDL par une voie dépendante de son interaction avec l'ApoE qui serait altérée avec l'isoforme APOE2. De même, l'ApoF pourrait agir de façon intracellulaire pour favoriser la présence des récepteurs LDLR et/ou LRP1 à la membrane mais qui serait sans effet chez les souris APOE2-KI.

3.2. L'ApoF favorise la lipolyse intravasculaire ?

L'ApoF pourrait également augmenter, de façon indirecte, la capture des *remnants* de VLDL. Il est possible que l'ApoF favorise la lipolyse des VLDL qui entrainerait alors une augmentation de la production de *remnants* et favoriserait leur capture. Dans ce cas, l'utilisation d'un modèle de clairance retardée n'est pas capable d'éliminer l'excédent de *remnants* produit quand l'ApoF est surexprimée. Nous n'avons pas observé de modification de l'activité de la LPL ni de la HL chez les souris Ad-hApoF (**Figure 31B**). Toutefois, lors de ce test, l'activité des lipases a été mesurée en évaluant la lipolyse de particules reconstituées de type VLDL et non de VLDL autologues. Nous ne pouvons donc pas exclure que la composition protéique des VLDL provenant des souris Ad-hApoF influence l'activité de ces enzymes. En effet, une expérience préliminaire que nous avons réalisée dans le modèle de souris dyslipidémiques APOE*3-Leiden.CETP a montré que la surexpression de l'ApoF augmente la capture des acides gras libres par les tissus adipeux bruns suggérant une augmentation de la lipolyse des VLDL (**Figure 33C**). Toutefois, le transgène APOE*3-Leiden n'a pas les mêmes caractéristiques que l'APOE2. Il est composé d'un mutant du gène de l'APOE3 et du gène de l'APOC1²⁶³. Bien qu'il conduise également au développement d'un profil hyperlipidémique, l'APOE*3-Leiden conserve une affinité correcte pour LDLR et LRP1 conduisant à une hyperlipidémie moins sévère que l'APOE2²⁶². D'autre part, ces souris expriment également la CETP dont l'activité pourrait potentiellement être inhibée par l'ApoF^{198,202}. Dans ce cas, bien que nous ne l'ayons pas mesuré au cours de cette expérience, la surexpression de l'APOF pourrait modifier la répartition du cholestérol dans les différents types de lipoprotéines. Pour réellement comprendre l'influence de l'ApoF dans ces modèles, des expériences supplémentaires sont indispensables. Afin de valider ou

non ces différentes hypothèses, il est nécessaire d'évaluer l'impact de la surexpression de l'APOF sur l'activité de la CETP chez les souris APOE*3-Leiden.CETP et sur la capture des VLDL et l'activité lipolytique chez les souris APOE2-KI.

3.3. L'ApoF favorise la capture ou la production intestinale de chylomicrons ?

Après un gavage à l'huile d'olive, l'augmentation de la lipémie post-prandiale est atténuée par la surexpression de l'APOF (**Figure 31A**). Cependant, dans cette expérience, nous avons suivi la sécrétion et la clairance des chylomicrons puisque les lipides alimentaires sont digérés et assemblés dans l'intestin³. L'ApoF n'est pas exprimée par l'intestin¹⁸⁷ et l'adénovirus de sérotype 5 utilisé pour la surexpression de l'APOF est très spécifique du foie²³⁵. La surexpression de l'APOF dans ce modèle ne devrait donc pas avoir un rôle direct sur la production et la sécrétion des chylomicrons bien que nous ne l'ayons pas mesuré. Nous ne pouvons pas exclure que l'accélération de la clairance des TG plasmatiques puisse être expliquée par des effets indirects de la surexpression hépatique de l'APOF sur la capture intestinale des TG. Toutefois, l'intestin semble jouer un rôle peu important dans la capture des particules riches en TG comme le suggère une étude montrant que celles-ci sont rapidement captées par le foie²⁶⁴. L'ApoF peut également jouer un rôle plus tardif par exemple dans la voie du TICE par l'augmentation de la capture des LDL²⁶⁵, bien qu'elles contiennent peu de TG comparées aux *remnants* de chylomicrons. Afin de valider que la diminution de la lipémie post-prandiale est uniquement liée à une augmentation de la clairance hépatique, il serait intéressant de mesurer la sécrétion des chylomicrons par l'intestin ainsi que leur composition lorsque l'APOF est surexprimée. Par ailleurs, il serait important de mesurer l'influence de l'ApoF sur la clairance intestinale des chylomicrons.

Ces résultats suggèrent que la surexpression de l'APOF favorise la diminution des TG en condition post-prandial. Étant donné que l'augmentation des concentrations plasmatiques de TG post-prandiaux augmente le risque cardiovasculaire^{266,267}, l'augmentation de l'expression de l'APOF dans le foie semble bénéfique.

4. Rôles de l'ApoF dans le développement de la NAFLD

Grâce à des données issues d'une cohorte de patients obèses et de patients atteints de NAFLD, nous avons montré, que plus la stéatose hépatique est sévère, plus l'expression de l'APOF dans le foie est faible (**Figure 23A et 43A**). De plus, son expression est diminuée de moitié chez patients atteints de NASH (**Figure 43B**). Ces données sont en accord avec de précédentes études qui ont montré qu'une diminution de l'expression en ARNm ou en

protéines de l'ApoF dans le foie ou le plasma est associée à des atteintes hépatiques faisant partie du spectre des NAFLD.

Une étude transcriptomique a permis de montrer que l'expression de l'ApoF était diminuée dans les foies de patients atteints d'obésité morbide (IMC = 54,5 +/- 3,9) comparés à d'autres patients ayant subi une perte de poids importante suite à une chirurgie bariatrique²⁶⁸. De plus, la concentration plasmatique de l'ApoF est diminuée chez des patients atteints de NASH comparés à des patients ayant une simple stéatose hépatique²¹⁹. Chez des patients atteints de carcinome hépatocellulaire, une complication des NAFLD, les expressions en ARNm et en protéines de l'ApoF sont diminuées dans la partie tumorale du foie comparée aux tissus hépatiques sains adjacents du même patient. Par ailleurs, une faible expression hépatique de l'ApoF est également associée à un moins bon pronostic chez ces patients²²⁰. Pour finir, une analyse protéomique montre également que la quantité d'ApoF plasmatique est diminuée chez les patients atteints d'une cirrhose due à une infection par le virus de l'hépatite C²⁶⁹. Pour finir, nous montrons également que l'expression hépatique de l'APOF est augmentée après résolution de la NASH par une chirurgie bariatrique (**Figure 43D**). Tous ces éléments suggèrent que les concentrations plasmatique et hépatique de l'ApoF sont fortement corrélées avec la sévérité de la NAFLD.

Au cours de ce projet, nous avons, dans un premier temps, cherché à déterminer si la diminution de l'expression de l'ApoF est une cause de l'aggravation de la NAFLD et, à l'inverse, si l'augmentation de son expression peut améliorer les caractéristiques de la NASH. Alors qu'en contexte physiologique, l'augmentation de l'expression de l'APOF semble jouer un rôle bénéfique puisqu'elle permet l'exportation des TG du foie, les expériences réalisées dans le contexte de la NAFLD indiquent le contraire. En effet, la surexpression de l'APOF chez des souris nourries avec un régime permettant d'induire la NASH s'associe au développement d'un profil lipoprotéique délétère (augmentation du nombre de LDL et diminution du HDL-C) ainsi qu'à une aggravation de l'inflammation hépatique (**Figure 45E et F**). Toutefois, l'observation des coupes histologiques en microscopie confocale révèle une augmentation de l'intensité de fluorescence de la GFP pour le groupe Ad-hApoF comparée au groupe contrôle (**Figure 47E**). Cela suggère que les doses de virus injectées ne sont pas équivalentes entre les deux groupes et peuvent influencer différemment l'état inflammatoire du foie. Afin de s'affranchir de ces effets, il serait préférable de reproduire cette expérience avec des AAV qui permettront également de visualiser à plus long terme les effets de l'augmentation de l'expression de l'APOF sur le développement de la NAFLD.

Dans un deuxième temps, nous avons cherché à déterminer si l'absence précoce de l'ApoF dans le foie est capable d'accélérer le développement de la NAFLD. Nous avons montré que

les souris ApoF-KO nourries avec un régime permettant d'induire la NASH pendant 20 semaines exacerbe plusieurs comorbidités de la NAFLD, à savoir, l'obésité, l'augmentation de la glycémie à jeun et la dyslipidémie (**Figure 48**). Bien que ces éléments suggèrent une aggravation générale du syndrome métabolique, la mesure des transaminases ne semblent pas indiquer une exacerbation des lésions hépatiques chez les souris ApoF-KO (**Figure 48B**). En effet, après 20 semaines de régime, chez les souris ApoF-KO, aucun nodule n'est détecté à la surface du foie contrairement aux souris contrôles (données non présentées). Dans ce contexte, cette observation suggère une protection contre le développement des complications de la NASH en l'absence de l'ApoF. Ces résultats sont en désaccord avec une autre étude ayant montré une importante réduction de la taille des tumeurs chez des souris surexprimant l'ApoF ayant subi une xénogreffe de cellules de carcinome hépatocellulaire (MHCC97)²²⁰. Cette étude suggère que l'ApoF pourrait avoir une fonction suppresseur de tumeur et que sa diminution pourrait donc favoriser l'aggravation de la NASH vers le carcinome hépatocellulaire. Néanmoins, les observations réalisées chez les souris ApoF-KO nécessitent des vérifications supplémentaires puisque l'analyse histologique des foies de ces souris est toujours en cours.

Dans l'ensemble, nos résultats suggèrent que la diminution de l'expression de l'ApoF n'est pas responsable du développement de la NASH. En ce sens, nous avons montré qu'une stimulation au TNF α diminue l'expression de l'ApoF *in vitro* (**Figure 41B**). La sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, notamment par les cellules immunitaires du tissu adipeux et du foie⁸², est une composante importante de l'évolution de la NAFLD. Ainsi, la diminution de l'expression de l'APOF chez les patients atteints de NASH pourrait, en partie, être la conséquence du développement de l'inflammation. De plus, il est montré que la diminution de l'expression de l'ApoF par un shARN dans des cultures primaires de fibroblastes de rat-taube nu diminue la formation de gouttelettes lipidiques alors que sa surexpression favorise leur accumulation²⁷⁰. Toutefois, l'ApoF n'est pas exprimée dans les fibroblastes chez l'homme. Il serait donc intéressant de reproduire ces résultats dans un modèle d'hépatocytes afin de déterminer si nous retrouvons cet effet. Ces résultats pourraient expliquer la diminution de l'expression de l'ApoF comme étant un mécanisme compensatoire visant à protéger le foie contre l'accumulation excessive de lipides.

Pour conclure, l'ensemble des données disponibles concernant le rôle de l'ApoF sont parfois contradictoires. A l'heure actuelle, il est difficile de déterminer si la réduction de l'expression de l'ApoF chez les patients atteints de NAFLD est délétère ou protectrice.

5. Rôles de l'ApoF dans le développement de l'athérosclérose

Au cours de nos différentes expériences, nous avons observé que la modulation de l'expression de l'ApoF est fortement associée à des changements dans les concentrations plasmatiques de lipoprotéines. En effet, la diminution partielle ou totale de l'expression de l'ApoF favorise l'augmentation des VLDL-TG dans le plasma (**Figure 27F et 29E**). D'autre part, après un régime riche en lipides, la délétion de l'ApoF est associée à une augmentation du TC plasmatique (**Figure 48F**). Or, l'hypertriglycéridémie et l'hypercholestérolémie sont des facteurs de risques au développement des maladies cardiovasculaires^{66,67}. Alors que la délétion de l'ApoF semble favoriser le développement d'un profil lipoprotéique délétère, l'augmentation de son expression, au contraire, diminue la concentration plasmatique de TG (**Figure 25B**). Dans ce contexte, plusieurs études cliniques ont montré une association de la quantité d'ApoF dans le plasma avec les maladies cardiovasculaires. Parmi elles, une étude s'est intéressée à la composition du protéome des HDL provenant de patients atteints de maladies coronariennes (défini comme ayant plus de 50% de sténose dans l'artère coronaire). Il est ainsi montré que, d'une part, la quantité d'ApoF sur les HDL₃ est inférieure à celle retrouvée chez les patients sains et, d'autre part, qu'elle augmente lors de traitement hypolipémiant (statine/niacine) de ces mêmes patients²¹⁷. De plus, une étude prospective a également montré que, 96 heures après un AVC, les HDL sont enrichies en ApoF par rapport aux sujets n'ayant pas subi d'AVC. Cet enrichissement semble avoir un rôle bénéfique puisqu'il corrèle avec l'amélioration des symptômes 3 mois après l'AVC²¹⁸. Ces différentes études suggèrent que l'enrichissement en ApoF des HDL est associé à des effets protecteurs contre les maladies cardiovasculaires.

Bien que nous observons des modifications dans les lipides plasmatiques suite à la délétion de l'ApoF, notre modèle ne nous permet pas d'évaluer son impact sur le développement des maladies cardiovasculaires, et plus spécifiquement de l'athérosclérose. En effet, chez les souris sauvages (C57BL6/J WT), la majorité du cholestérol plasmatique est contenu dans les HDL, aussi ces souris ne constituent donc pas un bon modèle d'étude pour l'athérosclérose. Le modèle de souris déficientes pour LDLR est, au contraire, un des modèles le plus couramment utilisé pour l'étude de cette pathologie²⁷¹. Ainsi, l'impact de la délétion de l'ApoF sur le développement de l'athérosclérose a été évalué chez des souris déficientes pour LDLR soumises à un régime de type « *Western diet* » (0,21% cholestérol, 1% huile de maïs) pendant 16 semaines. De manière surprenante, il a été montré que la déficience en ApoF est protectrice contre le développement de l'athérosclérose. En effet, une diminution de 39% de la surface de la plaque d'athérome ainsi qu'une diminution de l'infiltration de macrophages sont observées au niveau de l'aorte, malgré l'absence d'améliorations du profil

lipidique plasmatique²⁰⁵. Toutefois, ces souris déficientes pour l'*ApoF* présentent également une délétion de l'*Apon* et de *Stat2* et les résultats de cette étude suggèrent que l'effet protecteur serait attribuable à la délétion de *Stat2* plutôt qu'à celle de l'*ApoF*. Afin de vérifier que la délétion de *Stat2* et *Apon* ne masque pas un effet négatif de l'ApoF sur le développement de l'athérosclérose, il serait intéressant de reproduire cette expérience avec notre modèle de souris déficientes spécifiquement pour l'ApoF croisé avec des souris LDLR-KO.

6. Régulation de l'ApoF

Au cours de ce projet, nous avons également cherché à identifier les acteurs impliqués dans la régulation de l'ApoF. Dans un premier temps, nous avons testé l'impact de la stimulation de plusieurs récepteurs nucléaires qui ont été décrits comme modulateur de son expression. Plus précisément, les récepteurs nucléaires LXR et PPAR α pourraient réprimer l'expression de l'ApoF²⁰⁸ alors que FXR pourrait induire son expression²⁰⁹. Toutefois, lors de la stimulation de ces différents récepteurs nucléaires, aucune modulation de l'expression de l'ApoF n'a été mesurée (**Figure 39**). De plus, la répression de l'expression de l'ApoF par PPAR α n'est pas cohérente avec plusieurs données de la littérature. Comme décrit en introduction (voir partie III-3.1), la stimulation de PPAR α améliore la dyslipidémie alors que la diminution de la quantité d'ApoF est associée à une augmentation des TG plasmatiques et une diminution du HDL-C. De plus, il a été décrit que la diminution de l'expression de PPAR α est associée à une augmentation de la sévérité de la NASH¹²⁹. Si l'ApoF est réprimée par PPAR α , nous nous attendons alors à ce que son expression soit augmentée chez les patients atteints de NASH. Or, notre étude (**Figure 43B**) ainsi que celle de Kumar *et al.*²¹⁹ observent l'effet inverse.

Dans un second temps, nous avons cherché à déterminer si une stimulation par les glucides (glucose) ou les lipides (acides gras et cholestérol) est capable d'induire ou de réprimer l'expression de l'ApoF. Alors que les stimulations par les acides gras et le cholestérol ne modifient pas l'expression de l'ApoF, nous observons une forte induction de son expression après une stimulation au glucose *in vitro* et *in vivo* (**Figure 40**). Ces résultats suggèrent que l'expression de l'ApoF est augmentée en condition post-prandiale. Sachant que les facteurs de transcription ChREBP²⁷² et *hepatocyte nuclear factor 4* (HNF4)²⁷³ sont activés par le glucose et FoxO1 inhibé par l'insuline²⁷⁴, il serait intéressant de déterminer si l'expression de l'ApoF est régulée par l'un de ces facteurs.

7. Limites de ce projet

Ce projet comporte plusieurs limites techniques.

Premièrement, le choix de l'isoforme, nous avons choisi de surexprimer l'isoforme humaine de l'ApoF et non l'isoforme murine dans notre modèle de souris. Lagor et al. ont montré que la surexpression de l'isoforme humaine ou murine de l'ApoF entraîne le même effet sur le transport inverse du cholestérol¹⁸⁵. Nous nous attendions donc à obtenir des résultats similaires avec la surexpression de l'ApoF murine bien que nous ne l'ayons pas vérifié.

Deuxièmement, nous avons étudié l'effet de la délétion totale de l'ApoF chez la souris et non une délétion spécifique des hépatocytes. Néanmoins, nous avons choisi cette stratégie en première intention. Pour cela, nous avons généré une lignée de souris exprimant l'endonucléase Cas9 (*Cas9 flox/flox*) et la Cre recombinase sous le contrôle de l'albumine afin de cibler les hépatocytes. Pour induire une mutation dans le gène de l'ApoF, ces souris ont reçu l'injection d'adénovirus exprimant des ARNg ciblant plusieurs endroits du gène de l'ApoF. Malheureusement, cette approche ne nous a pas permis d'obtenir une diminution suffisante de l'expression de l'ApoF dans les hépatocytes (réduction de l'expression de l'ApoF de 20 à 30% maximum) pour observer des changements du métabolisme. C'est pourquoi nous avons alors choisis d'utiliser un modèle de délétion totale de l'ApoF, plus rapide à mettre au point. Toutefois, l'ApoF étant une protéine presque exclusivement produite par le foie, sa délétion totale ne devrait pas influencer le métabolisme des autres tissus.

Enfin, nous avons développé un modèle *in vitro* pour mesurer la capture des particules dans l'hépatocyte. Pour renforcer et compléter notre hypothèse, il aurait été intéressant d'étudier l'influence de la surexpression de l'ApoF sur la capture des VLDL et des LDL *in vitro*. Cependant, dans nos conditions expérimentales, la proportion de cellules surexprimant l'ApoF après la transfection des cellules IHH était trop faible pour visualiser des effets.

D'autre part, l'utilisation d'un modèle murin pour l'étude des lipoprotéines comporte également des limitations. En effet, il existe un certain nombre de différences entre le métabolisme des lipoprotéines chez l'homme et chez la souris. Tout d'abord, les souris n'expriment pas la CETP¹⁸. En conséquence, le cholestérol est principalement retrouvé dans les HDL contrairement à l'homme où il est contenu en majorité dans les LDL et modifie la contribution de ces particules dans l'élimination du cholestérol plasmatique qui est donc assurée essentiellement par les HDL chez la souris mais par les LDL chez l'Homme. Bien que la répartition du cholestérol entre les LDL et les HDL soit différente, leur composition protéique est similaire entre les deux espèces. La plupart des apolipoprotéines majeures

(ApoA1, A2, A4, E, M et C) sont retrouvées²⁷⁵. La différence majeure de la composition protéique des VLDL réside en l'ApoB48. A l'inverse de la souris, cette isoforme de l'ApoB est retrouvée uniquement sur les chylomicrons chez l'homme⁶. La présence de l'ApoB48 sur les VLDL chez la souris influence le métabolisme de ces particules. L'ApoB48 ne possède pas de domaines de liaison au LDLR. Par conséquent, la clairance des VLDL contenant l'ApoB48 est totalement dépendante de l'ApoE. D'autre part, une étude a montré que les VLDL contenant l'ApoB48 sont de meilleurs substrats pour la LPL que les VLDL contenant l'ApoB100²⁷⁶.

Pour finir, les modèles murins de NAFLD présentent également certaines limitations. Tout d'abord, il existe un grand nombre de modèles animaux se basant majoritairement sur l'utilisation d'un régime hypercalorique mais aussi sur des modèles génétiques. Toutefois, ces différents modèles ne permettent pas de reproduire de façon similaire la physiopathologie et toutes les caractéristiques de la maladie. Par ailleurs, les modèles murins de NASH ne sont pas capables d'induire la ballonnisation des hépatocytes qui est une caractéristique importante de la NASH chez l'homme²⁷⁷. En ce sens, notre modèle comporte certains inconvénients. Il permet le développement de plusieurs caractéristiques de la NASH et de ses comorbidités, à savoir, une augmentation du poids corporel, une perturbation de l'homéostasie glucidique et une dyslipidémie. Au niveau hépatique, on observe le développement d'une stéatose et de foyers inflammatoires. Toutefois, nous n'observons pas la ballonnisation des hépatocytes et le développement de la fibrose est très faible.

8. Conclusion

Pour conclure, au cours de projet nous avons mis en évidence un nouveau rôle de l'ApoF dans le métabolisme des lipoprotéines, plus particulièrement, sur la sécrétion des VLDL et sur la clairance des *remnants*. Malgré un rôle bénéfique de l'ApoF sur les lipides plasmatiques en condition physiologique, il est, pour le moment, difficile de déterminer le rôle exact de l'ApoF dans le développement de la NAFLD.

Bibliographie

Les illustrations ont été créées avec Biorender.com ou smart.servier.com.

1. Feingold, K. R. Introduction to Lipids and Lipoproteins. in *Endotext* (eds. Feingold, K. R. et al.) (MDText.com, Inc., 2000).
2. Cohen, D. E. & Fisher, E. A. Lipoprotein metabolism, dyslipidemia, and nonalcoholic fatty liver disease. *Semin. Liver Dis.* **33**, 380–388 (2013).
3. Ko, C.-W., Qu, J., Black, D. D. & Tso, P. Regulation of intestinal lipid metabolism: current concepts and relevance to disease. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **17**, 169–183 (2020).
4. Rye, K.-A. & Barter, P. J. Regulation of high-density lipoprotein metabolism. *Circ. Res.* **114**, 143–156 (2014).
5. Schmidt, K., Noureen, A., Kronenberg, F. & Utermann, G. Structure, function, and genetics of lipoprotein (a). *J. Lipid Res.* **57**, 1339–1359 (2016).
6. Greeve, J., Altkemper, I., Dieterich, J. H., Greten, H. & Windler, E. Apolipoprotein B mRNA editing in 12 different mammalian species: hepatic expression is reflected in low concentrations of apoB-containing plasma lipoproteins. *J. Lipid Res.* **34**, 1367–1383 (1993).
7. Segrest, J. P. *et al.* The amphipathic helix in the exchangeable apolipoproteins: a review of secondary structure and function. *J. Lipid Res.* **33**, 141–166 (1992).
8. Barrows, B. R. & Parks, E. J. Contributions of different fatty acid sources to very low-density lipoprotein-triacylglycerol in the fasted and fed states. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **91**, 1446–1452 (2006).
9. Rai, P. *et al.* Kinesin-dependent mechanism for controlling triglyceride secretion from the liver. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **114**, 12958–12963 (2017).
10. Yen, C.-L. E., Stone, S. J., Koliwad, S., Harris, C. & Farese, R. V. DGAT enzymes and triacylglycerol biosynthesis. *J. Lipid Res.* **49**, 2283–2301 (2008).

11. Sirwi, A. & Hussain, M. M. Lipid transfer proteins in the assembly of apoB-containing lipoproteins. *J. Lipid Res.* **59**, 1094–1102 (2018).
12. Jamil, H. *et al.* Microsomal triglyceride transfer protein. Specificity of lipid binding and transport. *J. Biol. Chem.* **270**, 6549–6554 (1995).
13. Wu, S. A., Kersten, S. & Qi, L. Lipoprotein Lipase and Its Regulators: An Unfolding Story. *Trends Endocrinol. Metab. TEM* **32**, 48–61 (2021).
14. Hoeke, G., Kooijman, S., Boon, M. R., Rensen, P. C. N. & Berbée, J. F. P. Role of Brown Fat in Lipoprotein Metabolism and Atherosclerosis. *Circ. Res.* **118**, 173–182 (2016).
15. Khedoe, P. P. S. J. *et al.* Brown adipose tissue takes up plasma triglycerides mostly after lipolysis. *J. Lipid Res.* **56**, 51–59 (2015).
16. Young, S. G. *et al.* GPIHBP1 and lipoprotein lipase, partners in plasma triglyceride metabolism. *Cell Metab.* **30**, 51–65 (2019).
17. Shrestha, S., Wu, B. J., Guiney, L., Barter, P. J. & Rye, K.-A. Cholesteryl ester transfer protein and its inhibitors. *J. Lipid Res.* **59**, 772–783 (2018).
18. Hogarth, C. A., Roy, A. & Ebert, D. L. Genomic evidence for the absence of a functional cholesteryl ester transfer protein gene in mice and rats. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* **135**, 219–229 (2003).
19. Wang, Z. *et al.* Comparative studies of three cholesteryl ester transfer proteins and their interactions with known inhibitors. *PLoS ONE* **12**, e0180772 (2017).
20. Hussain, M. M., Strickland, D. K. & Bakillah, A. The mammalian low-density lipoprotein receptor family. *Annu. Rev. Nutr.* **19**, 141–172 (1999).
21. Foley, E. M. *et al.* Hepatic remnant lipoprotein clearance by heparan sulfate proteoglycans and low-density lipoprotein receptors depend on dietary conditions in mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **33**, 2065–2074 (2013).
22. Tao, W., Moore, R., Meng, Y., Smith, E. R. & Xu, X.-X. Endocytic adaptors Arh and Dab2 control homeostasis of circulatory cholesterol. *J. Lipid Res.* **57**, 809–817 (2016).

23. van de Sluis, B., Wijers, M. & Herz, J. News on the molecular regulation and function of hepatic low-density lipoprotein receptor and LDLR-related protein 1. *Curr. Opin. Lipidol.* **28**, 241–247 (2017).
24. Hua, X. *et al.* SREBP-2, a second basic-helix-loop-helix-leucine zipper protein that stimulates transcription by binding to a sterol regulatory element. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**, 11603–11607 (1993).
25. Sniderman, A. D. *et al.* Hepatic Cholesterol Homeostasis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **33**, 2481–2490 (2013).
26. Jeong, H. J. *et al.* Sterol-dependent regulation of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 expression by sterol-regulatory element binding protein-2. *J. Lipid Res.* **49**, 399–409 (2008).
27. Abifadel, M. *et al.* Mutations in PCSK9 cause autosomal dominant hypercholesterolemia. *Nat. Genet.* **34**, 154–156 (2003).
28. Cohen, J. C., Boerwinkle, E., Mosley, T. H. & Hobbs, H. H. Sequence variations in PCSK9, low LDL, and protection against coronary heart disease. *N. Engl. J. Med.* **354**, 1264–1272 (2006).
29. Zhang, D.-W. *et al.* Binding of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 to epidermal growth factor-like repeat A of low density lipoprotein receptor decreases receptor recycling and increases degradation. *J. Biol. Chem.* **282**, 18602–18612 (2007).
30. Zelcer, N., Hong, C., Boyadjian, R. & Tontonoz, P. LXR regulates cholesterol uptake through Idol-dependent ubiquitination of the LDL receptor. *Science* **325**, 100–104 (2009).
31. Gautier, T., Masson, D. & Lagrost, L. Métabolisme des lipides et des lipoprotéines chez l'homme. *EMC Elsevier Masson SAS Paris Endocrinol.-Nutr.* **10-368-A-10**, (2010).
32. Sarrazin, S., Lamanna, W. C. & Esko, J. D. Heparan Sulfate Proteoglycans. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **3**, a004952 (2011).
33. Gonzales, J. C., Gordts, P. L. S. M., Foley, E. M. & Esko, J. D. Apolipoproteins E and AV mediate lipoprotein clearance by hepatic proteoglycans. *J. Clin. Invest.* **123**, 2742–2751 (2013).

34. MacArthur, J. M. *et al.* Liver heparan sulfate proteoglycans mediate clearance of triglyceride-rich lipoproteins independently of LDL receptor family members. *J. Clin. Invest.* **117**, 153–164 (2007).
35. Wilsie, L. C., Gonzales, A. M. & Orlando, R. A. Syndecan-1 mediates internalization of apoE-VLDL through a low density lipoprotein receptor-related protein (LRP)-independent, non-clathrin-mediated pathway. *Lipids Health Dis.* **5**, 23 (2006).
36. Stanford, K. I. *et al.* Syndecan-1 is the primary heparan sulfate proteoglycan mediating hepatic clearance of triglyceride-rich lipoproteins in mice. *J. Clin. Invest.* **119**, 3236–3245 (2009).
37. Mahley, R. W. & Huang, Y. Atherogenic remnant lipoproteins: role for proteoglycans in trapping, transferring, and internalizing. *J. Clin. Invest.* **117**, 94–98 (2007).
38. Gustafsen, C. *et al.* Heparan sulfate proteoglycans present PCSK9 to the LDL receptor. *Nat. Commun.* **8**, 503 (2017).
39. Emerging Risk Factors Collaboration *et al.* Lipoprotein(a) concentration and the risk of coronary heart disease, stroke, and nonvascular mortality. *JAMA* **302**, 412–423 (2009).
40. Ruscica, M., Greco, M. F., Ferri, N. & Corsini, A. Lipoprotein(a) and PCSK9 inhibition: clinical evidence. *Eur. Heart J. Suppl.* **22**, L53–L56 (2020).
41. Kronenberg, F. & Utermann, G. Lipoprotein(a): resurrected by genetics. *J. Intern. Med.* **273**, 6–30 (2013).
42. Berliner, J. A., Leitinger, N. & Tsimikas, S. The role of oxidized phospholipids in atherosclerosis. *J. Lipid Res.* **50**, S207–S212 (2009).
43. Wang, N., Silver, D. L., Thiele, C. & Tall, A. R. ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1) functions as a cholesterol efflux regulatory protein. *J. Biol. Chem.* **276**, 23742–23747 (2001).
44. Patsch, J. R., Gotto, A. M., Olivercrona, T. & Eisenberg, S. Formation of high density lipoprotein2-like particles during lipolysis of very low density lipoproteins in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **75**, 4519–4523 (1978).
45. Asztalos, B. F. *et al.* Role of LCAT in HDL remodeling: investigation of LCAT deficiency states. *J. Lipid Res.* **48**, 592–599 (2007).

46. Nikkilä, E. A., Taskinen, M. R. & Sane, T. Plasma high-density lipoprotein concentration and subfraction distribution in relation to triglyceride metabolism. *Am. Heart J.* **113**, 543–548 (1987).
47. Barrans, A. *et al.* Hepatic lipase induces the formation of pre-beta 1 high density lipoprotein (HDL) from triacylglycerol-rich HDL2. A study comparing liver perfusion to in vitro incubation with lipases. *J. Biol. Chem.* **269**, 11572–11577 (1994).
48. Jahangiri, A. *et al.* Evidence that endothelial lipase remodels high density lipoproteins without mediating the dissociation of apolipoprotein A-I. *J. Lipid Res.* **46**, 896–903 (2005).
49. Settasatian, N. *et al.* The mechanism of the remodeling of high density lipoproteins by phospholipid transfer protein. *J. Biol. Chem.* **276**, 26898–26905 (2001).
50. Adorni, M. P. *et al.* The roles of different pathways in the release of cholesterol from macrophages. *J. Lipid Res.* **48**, 2453–2462 (2007).
51. Larrede, S. *et al.* Stimulation of cholesterol efflux by LXR agonists in cholesterol-loaded human macrophages is ABCA1-dependent but ABCG1-independent. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **29**, 1930–1936 (2009).
52. Shen, W.-J., Azhar, S. & Kraemer, F. B. SR-B1: A Unique Multifunctional Receptor for Cholesterol Influx and Efflux. *Annu. Rev. Physiol.* **80**, 95–116 (2018).
53. Phillips, M. C. Molecular Mechanisms of Cellular Cholesterol Efflux. *J. Biol. Chem.* **289**, 24020–24029 (2014).
54. Kennedy, M. A. *et al.* ABCG1 has a critical role in mediating cholesterol efflux to HDL and preventing cellular lipid accumulation. *Cell Metab.* **1**, 121–131 (2005).
55. Venkateswaran, A. *et al.* Control of cellular cholesterol efflux by the nuclear oxysterol receptor LXR alpha. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 12097–12102 (2000).
56. Gelissen, I. C. *et al.* ABCA1 and ABCG1 synergize to mediate cholesterol export to apoA-I. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **26**, 534–540 (2006).
57. Yvan-Charvet, L. *et al.* Combined deficiency of ABCA1 and ABCG1 promotes foam cell accumulation and accelerates atherosclerosis in mice. *J. Clin. Invest.* **117**, 3900–3908 (2007).

58. Libby, P. *et al.* Atherosclerosis. *Nat. Rev. Dis. Primer* **5**, 56 (2019).
59. Thuahnai, S. T., Lund-Katz, S., Williams, D. L. & Phillips, M. C. Scavenger receptor class B, type I-mediated uptake of various lipids into cells. Influence of the nature of the donor particle interaction with the receptor. *J. Biol. Chem.* **276**, 43801–43808 (2001).
60. Martinez, L. O. *et al.* Ectopic β -chain of ATP synthase is an apolipoprotein A-I receptor in hepatic HDL endocytosis. *Nature* **421**, 75–79 (2003).
61. Jacquet, S. *et al.* The nucleotide receptor P2Y₁₃ is a key regulator of hepatic High-Density Lipoprotein (HDL) endocytosis. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* **62**, 2508–2515 (2005).
62. Di Ciaula, A. *et al.* Bile Acid Physiology. *Ann. Hepatol.* **16**, S4–S14 (2017).
63. de Boer, J. F., Kuipers, F. & Groen, A. K. Cholesterol Transport Revisited: A New Turbo Mechanism to Drive Cholesterol Excretion. *Trends Endocrinol. Metab.* **29**, 123–133 (2018).
64. Di Taranto, M. D., Giacobbe, C. & Fortunato, G. Familial hypercholesterolemia: A complex genetic disease with variable phenotypes. *Eur. J. Med. Genet.* **63**, 103831 (2020).
65. Yanai, H. & Yoshida, H. Secondary dyslipidemia: its treatments and association with atherosclerosis. *Glob. Health Med.* **3**, 15–23 (2021).
66. Ivanova, E. A., Myasoedova, V. A., Melnichenko, A. A., Grechko, A. V. & Orekhov, A. N. Small Dense Low-Density Lipoprotein as Biomarker for Atherosclerotic Diseases. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2017**, 1273042 (2017).
67. Nordestgaard, B. G. Triglyceride-Rich Lipoproteins and Atherosclerotic Cardiovascular Disease: New Insights From Epidemiology, Genetics, and Biology. *Circ. Res.* **118**, 547–563 (2016).
68. Emerging Risk Factors Collaboration *et al.* Major lipids, apolipoproteins, and risk of vascular disease. *JAMA* **302**, 1993–2000 (2009).
69. Mani, P. *et al.* The Association Between HDL Particle Concentration and Incident Metabolic Syndrome in the Multi-ethnic Dallas Heart Study. *Diabetes Metab. Syndr.* **11**, S175–S179 (2017).
70. Bril, F. *et al.* Hepatic Steatosis and Insulin Resistance, But Not Steatohepatitis, Promote Atherogenic Dyslipidemia in NAFLD. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **101**, 644–652 (2016).

71. Chen, Z., Qin, H., Qiu, S., Chen, G. & Chen, Y. Correlation of triglyceride to high-density lipoprotein cholesterol ratio with nonalcoholic fatty liver disease among the non-obese Chinese population with normal blood lipid levels: a retrospective cohort research. *Lipids Health Dis.* **18**, 162 (2019).
72. Peng, K., Mo, Z. & Tian, G. Serum Lipid Abnormalities and Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Adult Males. *Am. J. Med. Sci.* **353**, 236–241 (2017).
73. Yang, M. H., Sung, J. & Gwak, G.-Y. The associations between apolipoprotein B, A1, and the B/A1 ratio and nonalcoholic fatty liver disease in both normal-weight and overweight Korean population. *J. Clin. Lipidol.* **10**, 289–298 (2016).
74. Abdel-Misih, S. R. Z. & Bloomston, M. Liver anatomy. *Surg. Clin. North Am.* **90**, 643–653 (2010).
75. Haschek, W. M., Rousseaux, C. G. & Wallig, M. A. Chapter 9 - The Liver. in *Fundamentals of Toxicologic Pathology (Second Edition)* (eds. Haschek, W. M., Rousseaux, C. G. & Wallig, M. A.) 197–235 (Academic Press, 2010). doi:10.1016/B978-0-12-370469-6.00009-X.
76. Rui, L. Energy metabolism in the liver. *Compr. Physiol.* **4**, 177–197 (2014).
77. Schulze, R. J. & McNiven, M. A. Lipid Droplet Formation and Lipophagy in Fatty Liver Disease. *Semin. Liver Dis.* **39**, 283–290 (2019).
78. Quiroga, A. D. & Lehner, R. Pharmacological intervention of liver triacylglycerol lipolysis: The good, the bad and the ugly. *Biochem. Pharmacol.* **155**, 233–241 (2018).
79. Horton, J. D., Goldstein, J. L. & Brown, M. S. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J. Clin. Invest.* **109**, 1125–1131 (2002).
80. Luo, J., Yang, H. & Song, B.-L. Mechanisms and regulation of cholesterol homeostasis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **21**, 225–245 (2020).
81. Deprince, A., Haas, J. T. & Staels, B. Dysregulated lipid metabolism links NAFLD to cardiovascular disease. *Mol. Metab.* **42**, 101092 (2020).
82. Haas, J. T., Francque, S. & Staels, B. Pathophysiology and Mechanisms of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Annu. Rev. Physiol.* **78**, 181–205 (2016).

83. Angulo, P. *et al.* Liver Fibrosis, but No Other Histologic Features, Is Associated With Long-term Outcomes of Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology* **149**, 389-397.e10 (2015).
84. Mantovani, A. *et al.* Complications, morbidity and mortality of nonalcoholic fatty liver disease. *Metabolism*. **111S**, 154170 (2020).
85. Eslam, M., Sanyal, A. J., George, J., & International Consensus Panel. MAFLD: A Consensus-Driven Proposed Nomenclature for Metabolic Associated Fatty Liver Disease. *Gastroenterology* **158**, 1999-2014.e1 (2020).
86. Younossi, Z. M. *et al.* Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease-Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology. Baltim. Md* **64**, 73–84 (2016).
87. Baratta, F. *et al.* Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Fibrosis Associated With Increased Risk of Cardiovascular Events in a Prospective Study. *Clin. Gastroenterol. Hepatol. Off. Clin. Pract. J. Am. Gastroenterol. Assoc.* (2019) doi:10.1016/j.cgh.2019.12.026.
88. Sinn, D. H. *et al.* Non-alcoholic fatty liver disease and the incidence of myocardial infarction: A cohort study. *J. Gastroenterol. Hepatol.* (2019) doi:10.1111/jgh.14856.
89. Yoshitaka, H. *et al.* Nonoverweight nonalcoholic fatty liver disease and incident cardiovascular disease: A post hoc analysis of a cohort study. *Medicine (Baltimore)* **96**, e6712 (2017).
90. Chang, Y. *et al.* Alcoholic and non-alcoholic fatty liver disease and associations with coronary artery calcification: evidence from the Kangbuk Samsung Health Study. *Gut* **68**, 1667–1675 (2019).
91. Oni, E. *et al.* Nonalcoholic Fatty Liver Disease Is Associated With Arterial Distensibility and Carotid Intima-Media Thickness: (from the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis). *Am. J. Cardiol.* **124**, 534–538 (2019).
92. Zheng, J. *et al.* Association between nonalcoholic fatty liver disease and subclinical atherosclerosis: a cross-sectional study on population over 40 years old. *BMC Cardiovasc. Disord.* **18**, 147 (2018).

93. Day, C. P. & James, O. F. Steatohepatitis: a tale of two 'hits'? *Gastroenterology* **114**, 842–845 (1998).
94. Ormazabal, V. *et al.* Association between insulin resistance and the development of cardiovascular disease. *Cardiovasc. Diabetol.* **17**, 122 (2018).
95. Petersen, K. F. *et al.* The role of skeletal muscle insulin resistance in the pathogenesis of the metabolic syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 12587–12594 (2007).
96. Polyzos, S. A., Kountouras, J. & Mantzoros, C. S. Adipokines in nonalcoholic fatty liver disease. *Metabolism* **65**, 1062–1079 (2016).
97. Huang, W., Dedousis, N., Bandi, A., Lopaschuk, G. D. & O'Doherty, R. M. Liver triglyceride secretion and lipid oxidative metabolism are rapidly altered by leptin in vivo. *Endocrinology* **147**, 1480–1487 (2006).
98. Zhu, L. *et al.* Characterization of gut microbiomes in nonalcoholic steatohepatitis (NASH) patients: a connection between endogenous alcohol and NASH. *Hepatol. Baltim. Md* **57**, 601–609 (2013).
99. Miele, L. *et al.* Increased intestinal permeability and tight junction alterations in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatol. Baltim. Md* **49**, 1877–1887 (2009).
100. De Munck, T. J. I. *et al.* Intestinal permeability in human nonalcoholic fatty liver disease: A systematic review and meta-analysis. *Liver Int.* **40**, 2906–2916 (2020).
101. Anstee, Q. M. *et al.* Genome-wide association study of non-alcoholic fatty liver and steatohepatitis in a histologically characterised cohort☆. *J. Hepatol.* **73**, 505–515 (2020).
102. Romeo, S. *et al.* Genetic variation in PNPLA3 confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease. *Nat. Genet.* **40**, 1461–1465 (2008).
103. Kozlitina, J. *et al.* Exome-wide association study identifies a TM6SF2 variant that confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease. *Nat. Genet.* **46**, 352–356 (2014).

104. Chalasani, N. *et al.* Genome-wide association study identifies variants associated with histologic features of nonalcoholic Fatty liver disease. *Gastroenterology* **139**, 1567–1576, 1576.e1–6 (2010).
105. Mancina, R. M. *et al.* The MBOAT7-TMC4 Variant rs641738 Increases Risk of Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Individuals of European Descent. *Gastroenterology* **150**, 1219-1230.e6 (2016).
106. Luukkonen, P. K. *et al.* Human PNPLA3-I148M variant increases hepatic retention of polyunsaturated fatty acids. *JCI Insight* **4**, 127902 (2019).
107. Pirazzi, C. *et al.* Patatin-like phospholipase domain-containing 3 (PNPLA3) I148M (rs738409) affects hepatic VLDL secretion in humans and in vitro. *J. Hepatol.* **57**, 1276–1282 (2012).
108. Brouwers, M. C. G. J. *et al.* Relationship Between Nonalcoholic Fatty Liver Disease Susceptibility Genes and Coronary Artery Disease. *Hepatol. Commun.* **3**, 587–596 (2019).
109. Donnelly, K. L. *et al.* Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J. Clin. Invest.* **115**, 1343–1351 (2005).
110. Lambert, J. E., Ramos-Roman, M. A., Browning, J. D. & Parks, E. J. Increased de novo lipogenesis is a distinct characteristic of individuals with nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* **146**, 726–735 (2014).
111. Liu, D. J. *et al.* Exome-wide association study of plasma lipids in >300,000 individuals. *Nat. Genet.* **49**, 1758–1766 (2017).
112. Zhou, Y. *et al.* Circulating triacylglycerol signatures and insulin sensitivity in NAFLD associated with the E167K variant in TM6SF2. *J. Hepatol.* **62**, 657–663 (2015).
113. Simons, N. *et al.* PNPLA3, TM6SF2, and MBOAT7 Genotypes and Coronary Artery Disease. *Gastroenterology* **152**, 912–913 (2017).
114. Käräjämäki, A. J., Hukkanen, J., Kauma, H., Kesäniemi, Y. A. & Ukkola, O. Metabolic syndrome but not genetic polymorphisms known to induce NAFLD predicts increased total mortality in

- subjects with NAFLD (OPERA study). *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 1–8 (2019)
doi:10.1080/00365513.2019.1700428.
115. Nordestgaard, B. G., Nicholls, S. J., Langsted, A., Ray, K. K. & Tybjærg-Hansen, A. Advances in lipid-lowering therapy through gene-silencing technologies. *Nat. Rev. Cardiol.* **15**, 261–272 (2018).
116. Fabbrini, E. *et al.* Alterations in adipose tissue and hepatic lipid kinetics in obese men and women with nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* **134**, 424–431 (2008).
117. Mittendorfer, B., Yoshino, M., Patterson, B. W. & Klein, S. VLDL Triglyceride Kinetics in Lean, Overweight, and Obese Men and Women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **101**, 4151–4160 (2016).
118. Poulsen, M. K. *et al.* Impaired Insulin Suppression of VLDL-Triglyceride Kinetics in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **101**, 1637–1646 (2016).
119. Pastori, D. *et al.* Remnant Lipoprotein Cholesterol and Cardiovascular and Cerebrovascular Events in Patients with Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *J. Clin. Med.* **7**, E378 (2018).
120. Barchetta, I. *et al.* Relationship between hepatic and systemic angiopoietin-like 3, hepatic Vitamin D receptor expression and NAFLD in obesity. *Liver Int. Off. J. Int. Assoc. Study Liver* **40**, 2139–2147 (2020).
121. Hong, B. S. *et al.* Angiopoietin-like protein 8/betatrophin correlates with hepatocellular lipid content independent of insulin resistance in non-alcoholic fatty liver disease patients. *J. Diabetes Investig.* **9**, 952–958 (2018).
122. Lee, Y.-H. *et al.* Association between betatrophin/ANGPTL8 and non-alcoholic fatty liver disease: animal and human studies. *Sci. Rep.* **6**, 24013 (2016).
123. Yilmaz, Y., Ulukaya, E., Atug, O. & Dolar, E. Serum concentrations of human angiopoietin-like protein 3 in patients with nonalcoholic fatty liver disease: association with insulin resistance. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* **21**, 1247–1251 (2009).
124. Hyysalo, J. *et al.* Genetic variation in PNPLA3 but not APOC3 influences liver fat in non-alcoholic fatty liver disease. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **27**, 951–956 (2012).

125. Niu, T.-H. *et al.* Lack of association between apolipoprotein C3 gene polymorphisms and risk of nonalcoholic fatty liver disease in a Chinese Han population. *World J. Gastroenterol.* **20**, 3655–3662 (2014).
126. Petersen, K. F. *et al.* Apolipoprotein C3 gene variants in nonalcoholic fatty liver disease. *N. Engl. J. Med.* **362**, 1082–1089 (2010).
127. Zhang, R.-N. *et al.* APOC3 rs2070666 Is Associated with the Hepatic Steatosis Independently of PNPLA3 rs738409 in Chinese Han Patients with Nonalcoholic Fatty Liver Diseases. *Dig. Dis. Sci.* **61**, 2284–2293 (2016).
128. Caron, S. *et al.* Transcriptional activation of apolipoprotein CIII expression by glucose may contribute to diabetic dyslipidemia. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **31**, 513–519 (2011).
129. Francque, S. *et al.* PPAR α gene expression correlates with severity and histological treatment response in patients with non-alcoholic steatohepatitis. *J. Hepatol.* **63**, 164–173 (2015).
130. Borén, J. *et al.* Kinetic and Related Determinants of Plasma Triglyceride Concentration in Abdominal Obesity: Multicenter Tracer Kinetic Study. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **35**, 2218–2224 (2015).
131. Lucero, D. *et al.* Does non-alcoholic fatty liver impair alterations of plasma lipoproteins and associated factors in metabolic syndrome? *Clin. Chim. Acta Int. J. Clin. Chem.* **412**, 587–592 (2011).
132. McCullough, A. *et al.* HDL flux is higher in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **317**, E852–E862 (2019).
133. Hodson, L. & Gunn, P. J. The regulation of hepatic fatty acid synthesis and partitioning: the effect of nutritional state. *Nat. Rev. Endocrinol.* **15**, 689–700 (2019).
134. Haas, J. T. *et al.* Hepatic insulin signaling is required for obesity-dependent expression of SREBP-1c mRNA but not for feeding-dependent expression. *Cell Metab.* **15**, 873–884 (2012).
135. Smith, G. I. *et al.* Insulin resistance drives hepatic de novo lipogenesis in nonalcoholic fatty liver disease. *J. Clin. Invest.* **130**, 1453–1460 (2020).

136. McGarry, J. D., Leatherman, G. F. & Foster, D. W. Carnitine palmitoyltransferase I. The site of inhibition of hepatic fatty acid oxidation by malonyl-CoA. *J. Biol. Chem.* **253**, 4128–4136 (1978).
137. Roumans, K. H. M. *et al.* Hepatic saturated fatty acid fraction is associated with de novo lipogenesis and hepatic insulin resistance. *Nat. Commun.* **11**, 1891 (2020).
138. Zhang, D. *et al.* Lipogenic transcription factor ChREBP mediates fructose-induced metabolic adaptations to prevent hepatotoxicity. *J. Clin. Invest.* **127**, 2855–2867 (2017).
139. Lebeau, P. F. *et al.* Diet-induced hepatic steatosis abrogates cell-surface LDLR by inducing de novo PCSK9 expression in mice. *J. Biol. Chem.* **294**, 9037–9047 (2019).
140. Ruscica, M. *et al.* Liver fat accumulation is associated with circulating PCSK9. *Ann. Med.* **48**, 384–391 (2016).
141. Lebeau, P. F. *et al.* Pcsk9 knockout exacerbates diet-induced non-alcoholic steatohepatitis, fibrosis and liver injury in mice. *JHEP Rep. Innov. Hepatol.* **1**, 418–429 (2019).
142. Huang, X.-Y. *et al.* Low level of low-density lipoprotein receptor-related protein 1 predicts an unfavorable prognosis of hepatocellular carcinoma after curative resection. *PLoS One* **7**, e32775 (2012).
143. Hamlin, A. N. *et al.* Low-density lipoprotein receptor-related protein-1 dysfunction synergizes with dietary cholesterol to accelerate steatohepatitis progression. *J. Biol. Chem.* **293**, 9674–9684 (2018).
144. Laatsch, A. *et al.* Insulin stimulates hepatic low density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1) to increase postprandial lipoprotein clearance. *Atherosclerosis* **204**, 105–111 (2009).
145. Ioannou, G. N. The Role of Cholesterol in the Pathogenesis of NASH. *Trends Endocrinol. Metab. TEM* **27**, 84–95 (2016).
146. Gan, L. T. *et al.* Hepatocyte free cholesterol lipotoxicity results from JNK1-mediated mitochondrial injury and is HMGB1 and TLR4-dependent. *J. Hepatol.* **61**, 1376–1384 (2014).
147. Wang, X. *et al.* Cholesterol Stabilizes TAZ in Hepatocytes to Promote Experimental Non-alcoholic Steatohepatitis. *Cell Metab.* **31**, 969-986.e7 (2020).

148. Saeed, N., Nadeau, B., Shannon, C. & Tincopa, M. Evaluation of Dietary Approaches for the Treatment of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: A Systematic Review. *Nutrients* **11**, E3064 (2019).
149. Abdelbasset, W. K., Tantawy, S. A., Kamel, D. M., Alqahtani, B. A. & Soliman, G. S. A randomized controlled trial on the effectiveness of 8-week high-intensity interval exercise on intrahepatic triglycerides, visceral lipids, and health-related quality of life in diabetic obese patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Medicine (Baltimore)* **98**, e14918 (2019).
150. Shojaee-Moradie, F. *et al.* Exercise Training Reduces Liver Fat and Increases Rates of VLDL Clearance But Not VLDL Production in NAFLD. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **101**, 4219–4228 (2016).
151. Promrat, K. *et al.* Randomized Controlled Trial Testing the Effects of Weight Loss on Nonalcoholic Steatohepatitis (NASH). *Hepatol. Baltim. Md* **51**, 121–129 (2010).
152. Vilar-Gomez, E. *et al.* Weight Loss Through Lifestyle Modification Significantly Reduces Features of Nonalcoholic Steatohepatitis. *Gastroenterology* **149**, 367-378.e5; quiz e14-15 (2015).
153. Lassailly, G. *et al.* Bariatric Surgery Reduces Features of Nonalcoholic Steatohepatitis in Morbidly Obese Patients. *Gastroenterology* **149**, 379–388; quiz e15-16 (2015).
154. Caiazzo, R. *et al.* Roux-en-Y gastric bypass versus adjustable gastric banding to reduce nonalcoholic fatty liver disease: a 5-year controlled longitudinal study. *Ann. Surg.* **260**, 893–898; discussion 898-899 (2014).
155. Lassailly, G. *et al.* Bariatric Surgery Provides Long-term Resolution of Nonalcoholic Steatohepatitis and Regression of Fibrosis. *Gastroenterology* **159**, 1290-1301.e5 (2020).
156. Thereaux, J. *et al.* Long-term adverse events after sleeve gastrectomy or gastric bypass: a 7-year nationwide, observational, population-based, cohort study. *Lancet Diabetes Endocrinol.* **7**, 786–795 (2019).
157. Chávez-Talavera, O., Tailleux, A., Lefebvre, P. & Staels, B. Bile Acid Control of Metabolism and Inflammation in Obesity, Type 2 Diabetes, Dyslipidemia, and Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology* **152**, 1679-1694.e3 (2017).

158. Neuschwander-Tetri, B. A. *et al.* Farnesoid X nuclear receptor ligand obeticholic acid for non-cirrhotic, non-alcoholic steatohepatitis (FLINT): a multicentre, randomised, placebo-controlled trial. *Lancet Lond. Engl.* **385**, 956–965 (2015).
159. Younossi, Z. M. *et al.* Obeticholic acid for the treatment of non-alcoholic steatohepatitis: interim analysis from a multicentre, randomised, placebo-controlled phase 3 trial. *Lancet Lond. Engl.* **394**, 2184–2196 (2019).
160. Patel, K. *et al.* Cilofexor, a Nonsteroidal FXR Agonist, in Patients With Noncirrhotic NASH: A Phase 2 Randomized Controlled Trial. *Hepatol. Baltim. Md* **72**, 58–71 (2020).
161. Somm, E. & Jornayvaz, F. R. Fibroblast Growth Factor 15/19: From Basic Functions to Therapeutic Perspectives. *Endocr. Rev.* **39**, 960–989 (2018).
162. Eren, F. *et al.* Preliminary evidence of a reduced serum level of fibroblast growth factor 19 in patients with biopsy-proven nonalcoholic fatty liver disease. *Clin. Biochem.* **45**, 655–658 (2012).
163. Harrison, S. A. *et al.* NGM282 for treatment of non-alcoholic steatohepatitis: a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2 trial. *Lancet Lond. Engl.* **391**, 1174–1185 (2018).
164. Harrison, S. A. *et al.* NGM282 Improves Liver Fibrosis and Histology in 12 Weeks in Patients With Nonalcoholic Steatohepatitis. *Hepatol. Baltim. Md* **71**, 1198–1212 (2020).
165. Newsome, P. N. *et al.* Volixibat in adults with non-alcoholic steatohepatitis: 24-week interim analysis from a randomized, phase II study. *J. Hepatol.* **73**, 231–240 (2020).
166. Le, T.-A. *et al.* Effect of colesvelam on liver fat quantified by magnetic resonance in nonalcoholic steatohepatitis: a randomized controlled trial. *Hepatol. Baltim. Md* **56**, 922–932 (2012).
167. Dubois, V., Eeckhoutte, J., Lefebvre, P. & Staels, B. Distinct but complementary contributions of PPAR isotypes to energy homeostasis. *J. Clin. Invest.* **127**, 1202–1214 (2017).
168. Liss, K. H. H. & Finck, B. N. PPARs and nonalcoholic fatty liver disease. *Biochimie* **136**, 65–74 (2017).

169. Ratziu, V. *et al.* Rosiglitazone for nonalcoholic steatohepatitis: one-year results of the randomized placebo-controlled Fatty Liver Improvement with Rosiglitazone Therapy (FLIRT) Trial. *Gastroenterology* **135**, 100–110 (2008).
170. Ratziu, V. *et al.* Long-term efficacy of rosiglitazone in nonalcoholic steatohepatitis: results of the fatty liver improvement by rosiglitazone therapy (FLIRT 2) extension trial. *Hepatol. Baltim. Md* **51**, 445–453 (2010).
171. Bril, F. *et al.* Response to Pioglitazone in Patients With Nonalcoholic Steatohepatitis With vs Without Type 2 Diabetes. *Clin. Gastroenterol. Hepatol. Off. Clin. Pract. J. Am. Gastroenterol. Assoc.* **16**, 558-566.e2 (2018).
172. Cusi, K. *et al.* Long-Term Pioglitazone Treatment for Patients With Nonalcoholic Steatohepatitis and Prediabetes or Type 2 Diabetes Mellitus: A Randomized Trial. *Ann. Intern. Med.* **165**, 305–315 (2016).
173. Bays, H. E. *et al.* MBX-8025, a novel peroxisome proliferator receptor-delta agonist: lipid and other metabolic effects in dyslipidemic overweight patients treated with and without atorvastatin. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **96**, 2889–2897 (2011).
174. Ratziu, V. *et al.* Elafibranor, an Agonist of the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- α and - δ , Induces Resolution of Nonalcoholic Steatohepatitis Without Fibrosis Worsening. *Gastroenterology* **150**, 1147-1159.e5 (2016).
175. Staiger, H., Keuper, M., Berti, L., Hrabe de Angelis, M. & Häring, H.-U. Fibroblast Growth Factor 21-Metabolic Role in Mice and Men. *Endocr. Rev.* **38**, 468–488 (2017).
176. Sanyal, A. *et al.* Pegbelfermin (BMS-986036), a PEGylated fibroblast growth factor 21 analogue, in patients with non-alcoholic steatohepatitis: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2a trial. *Lancet Lond. Engl.* **392**, 2705–2717 (2019).
177. Ritter, M. J., Amano, I. & Hollenberg, A. N. Thyroid Hormone Signaling and the Liver. *Hepatol. Baltim. Md* **72**, 742–752 (2020).

178. Harrison, S. A. *et al.* Resmetirom (MGL-3196) for the treatment of non-alcoholic steatohepatitis: a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2 trial. *Lancet Lond. Engl.* **394**, 2012–2024 (2019).
179. Tziomalos, K., Athyros, V. G., Paschos, P. & Karagiannis, A. Nonalcoholic fatty liver disease and statins. *Metabolism.* **64**, 1215–1223 (2015).
180. Margerie, D. *et al.* Hepatic transcriptomic signatures of statin treatment are associated with impaired glucose homeostasis in severely obese patients. *BMC Med. Genomics* **12**, 80 (2019).
181. Armstrong, M. J. *et al.* Liraglutide safety and efficacy in patients with non-alcoholic steatohepatitis (LEAN): a multicentre, double-blind, randomised, placebo-controlled phase 2 study. *Lancet Lond. Engl.* **387**, 679–690 (2016).
182. Loomba, R. *et al.* GS-0976 Reduces Hepatic Steatosis and Fibrosis Markers in Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology* **155**, 1463-1473.e6 (2018).
183. Legry, V. *et al.* Bile Acid Alterations Are Associated With Insulin Resistance, but Not With NASH, in Obese Subjects. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **102**, 3783–3794 (2017).
184. Day, J. R. *et al.* Purification and molecular cloning of human apolipoprotein F. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **203**, 1146–1151 (1994).
185. Lagor, W. R. *et al.* Overexpression of apolipoprotein F reduces HDL cholesterol levels in vivo. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **29**, 40–46 (2009).
186. Olofsson, S. O., McConathy, W. J. & Alaupovic, P. Isolation and partial characterization of a new acidic apolipoprotein (apolipoprotein F) from high density lipoproteins of human plasma. *Biochemistry* **17**, 1032–1036 (1978).
187. Lagor, W. R. *et al.* The effects of apolipoprotein F deficiency on high density lipoprotein cholesterol metabolism in mice. *PLoS One* **7**, e31616 (2012).
188. Guillemot, J., Essalmani, R., Hamelin, J. & Seidah, N. G. Is there a link between proprotein convertase PC7 activity and human lipid homeostasis? *FEBS Open Bio* **4**, 741–745 (2014).

189. Kujiraoka, T. *et al.* Clinical significance of plasma apolipoprotein F in Japanese healthy and hypertriglyceridemic subjects. *J. Atheroscler. Thromb.* **20**, 380–390 (2013).
190. Nishide, T., Tollefson, J. H. & Albers, J. J. Inhibition of lipid transfer by a unique high density lipoprotein subclass containing an inhibitor protein. *J. Lipid Res.* **30**, 149–158 (1989).
191. Paromov, V. M. & Morton, R. E. Lipid transfer inhibitor protein defines the participation of high density lipoprotein subfractions in lipid transfer reactions mediated by cholesterol ester transfer protein (CETP). *J. Biol. Chem.* **278**, 40859–40866 (2003).
192. He, Y., Greene, D. J., Kinter, M. & Morton, R. E. Control of cholesteryl ester transfer protein activity by sequestration of lipid transfer inhibitor protein in an inactive complex. *J. Lipid Res.* **49**, 1529–1537 (2008).
193. Morton, R. E., Nunes, V., Izem, L. & Quintão, E. Markedly elevated lipid transfer inhibitor protein in hypercholesterolemic subjects is mitigated by plasma triglyceride levels. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **21**, 1642–1649 (2001).
194. von Zychlinski, A., Williams, M., McCormick, S. & Kleffmann, T. Absolute quantification of apolipoproteins and associated proteins on human plasma lipoproteins. *J. Proteomics* **106**, 181–190 (2014).
195. Morton, R. E., Gnizak, H. M., Greene, D. J., Cho, K.-H. & Paromov, V. M. Lipid transfer inhibitor protein (apolipoprotein F) concentration in normolipidemic and hyperlipidemic subjects. *J. Lipid Res.* **49**, 127–135 (2008).
196. Kumar, A., Gangadharan, B. & Zitzmann, N. Multiple reaction monitoring and multiple reaction monitoring cubed based assays for the quantitation of apolipoprotein F. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.* **1033–1034**, 278–286 (2016).
197. Wang, X., Driscoll, D. M. & Morton, R. E. Molecular cloning and expression of lipid transfer inhibitor protein reveals its identity with apolipoprotein F. *J. Biol. Chem.* **274**, 1814–1820 (1999).

198. Morton, R. E. & Greene, D. J. Regulation of lipid transfer between lipoproteins by an endogenous plasma protein: selective inhibition among lipoprotein classes. *J. Lipid Res.* **35**, 836–847 (1994).
199. Morton, R. E. & Greene, D. J. Suppression of lipid transfer inhibitor protein activity by oleate. A novel mechanism of cholesteryl ester transfer protein regulation by plasma free fatty acids. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **17**, 3041–3048 (1997).
200. Morton, R. E. & Greene, D. J. The capacity of various non-esterified fatty acids to suppress lipid transfer inhibitor protein activity is related to their perturbation of the lipoprotein surface. *Biochim. Biophys. Acta* **1486**, 275–284 (2000).
201. Morton, R. E. & Greene, D. J. CETP and lipid transfer inhibitor protein are uniquely affected by the negative charge density of the lipid and protein domains of LDL. *J. Lipid Res.* **44**, 2287–2296 (2003).
202. Morton, R. E., Liu, Y. & Izem, L. ApoF knockdown increases cholesteryl ester transfer to LDL and impairs cholesterol clearance in fat-fed hamsters. *J. Lipid Res.* **60**, 1868–1879 (2019).
203. Serdyuk, A. P. & Morton, R. E. Lipid transfer inhibitor protein defines the participation of lipoproteins in lipid transfer reactions: CETP has no preference for cholesteryl esters in HDL versus LDL. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **19**, 718–726 (1999).
204. Cardner, M. *et al.* Structure-function relationships of HDL in diabetes and coronary heart disease. *JCI Insight* **5**, 131491 (2020).
205. Lagor, W. R. *et al.* Genetic manipulation of the ApoF/Stat2 locus supports an important role for type I interferon signaling in atherosclerosis. *Atherosclerosis* **233**, 234–241 (2014).
206. Korstanje, R. *et al.* Quantitative trait locus mapping of genes that regulate phospholipid transfer activity in SM/J and NZB/BINJ inbred mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **24**, 155–160 (2004).
207. He, Y., Kothari, V. & Bornfeldt, K. E. High-Density Lipoprotein Function in Cardiovascular Disease and Diabetes Mellitus. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **38**, e10–e16 (2018).

208. Liu, Y., Izem, L. & Morton, R. E. Identification of a hormone response element that mediates suppression of APOF by LXR and PPAR α agonists. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids* **1865**, 158583 (2020).
209. Li, L. *et al.* Farnesoid X receptor up-regulates expression of lipid transfer inhibitor protein in liver cells and mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **441**, 880–885 (2013).
210. Guérin, M., Bruckert, E., Dolphin, P. J., Turpin, G. & Chapman, M. J. Fenofibrate reduces plasma cholesteryl ester transfer from HDL to VLDL and normalizes the atherogenic, dense LDL profile in combined hyperlipidemia. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **16**, 763–772 (1996).
211. Izem, L. & Morton, R. E. Molecular cloning of hamster lipid transfer inhibitor protein (apolipoprotein F) and regulation of its expression by hyperlipidemia. *J. Lipid Res.* **50**, 676–684 (2009).
212. Zou, Y. *et al.* Effects of high dietary fat and cholesterol on expression of PPAR alpha, LXR alpha, and their responsive genes in the liver of apoE and LDLR double deficient mice. *Mol. Cell. Biochem.* **323**, 195–205 (2009).
213. Wang, B. & Tontonoz, P. Liver X receptors in lipid signalling and membrane homeostasis. *Nat. Rev. Endocrinol.* **14**, 452–463 (2018).
214. Lefebvre, P., Benomar, Y. & Staels, B. Retinoid X receptors: common heterodimerization partners with distinct functions. *Trends Endocrinol. Metab. TEM* **21**, 676–683 (2010).
215. Mamoon, A., Subauste, A., Subauste, M. C. & Subauste, J. Retinoic acid regulates several genes in bile acid and lipid metabolism via upregulation of small heterodimer partner in hepatocytes. *Gene* **550**, 165–170 (2014).
216. Shen, X.-B. *et al.* Transcriptional regulation of the apolipoprotein F (ApoF) gene by ETS and C/EBP α in hepatoma cells. *Biochimie* **112**, 1–9 (2015).
217. Green, P. S. *et al.* Combined statin and niacin therapy remodels the high-density lipoprotein proteome. *Circulation* **118**, 1259–1267 (2008).

218. Plubell, D. L. *et al.* High-Density Lipoprotein Carries Markers That Track With Recovery From Stroke. *Circ. Res.* **127**, 1274–1287 (2020).
219. Kumar, A., Gangadharan, B., Cobbold, J., Thursz, M. & Zitzmann, N. Absolute quantitation of disease protein biomarkers in a single LC-MS acquisition using apolipoprotein F as an example. *Sci. Rep.* **7**, 12072 (2017).
220. Wang, Y.-B. *et al.* Decreased expression of ApoF associates with poor prognosis in human hepatocellular carcinoma. *Gastroenterol. Rep.* **7**, 354–360 (2019).
221. Haas, J. T. *et al.* Transcriptional Network Analysis Implicates Altered Hepatic Immune Function in NASH development and resolution. *Nat. Metab.* **1**, 604–614 (2019).
222. Wouters, K. *et al.* Dietary cholesterol, rather than liver steatosis, leads to hepatic inflammation in hyperlipidemic mouse models of nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology. Baltim. Md* **48**, 474–486 (2008).
223. Tollefson, A. E., Kuppuswamy, M., Shashkova, E. V., Doronin, K. & Wold, W. S. M. Preparation and titration of CsCl-banded adenovirus stocks. *Methods Mol. Med.* **130**, 223–235 (2007).
224. Caron, S. *et al.* Farnesoid X receptor inhibits the transcriptional activity of carbohydrate response element binding protein in human hepatocytes. *Mol. Cell. Biol.* **33**, 2202–2211 (2013).
225. Asset, G., Baugé, E., Wolff, R. L., Fruchart, J. C. & Dallongeville, J. Pinus pinaster oil affects lipoprotein metabolism in apolipoprotein E-deficient mice. *J. Nutr.* **129**, 1972–1978 (1999).
226. Berbée, J. F. P. *et al.* Brown fat activation reduces hypercholesterolaemia and protects from atherosclerosis development. *Nat. Commun.* **6**, 6356 (2015).
227. Julve, J., Robert, M. Q., Llobera, M. & Peinado-Onsurbe, J. Hormonal regulation of lipoprotein lipase activity from 5-day-old rat hepatocytes. *Mol. Cell. Endocrinol.* **116**, 97–104 (1996).
228. Ehnholm, C. & Kuusi, T. Preparation, characterization, and measurement of hepatic lipase. *Methods Enzymol.* **129**, 716–738 (1986).
229. Blanchard, V. *et al.* A high-throughput mass spectrometry-based assay for large-scale profiling of circulating human apolipoproteins. *J. Lipid Res.* **61**, 1128–1139 (2020).

230. Zenkova, D., Kamenev, V., Sablina, R., Artyomov, M. & Sergushichev, A. Phantasm: visual and interactive gene expression analysis. (2018) doi:10.18129/B9.bioc.phantasm.
231. Hennuyer, N. *et al.* Beneficial effects of fibrates on apolipoprotein A-I metabolism occur independently of any peroxisome proliferative response. *Circulation* **99**, 2445–2451 (1999).
232. Coilly, A., Desterke, C., Guettier, C., Samuel, D. & Chiappini, F. FABP4 and MMP9 levels identified as predictive factors for poor prognosis in patients with nonalcoholic fatty liver using data mining approaches and gene expression analysis. *Sci. Rep.* **9**, 19785 (2019).
233. Pawella, L. M. *et al.* Perilipin discerns chronic from acute hepatocellular steatosis. *J. Hepatol.* **60**, 633–642 (2014).
234. Guo, L. *et al.* Enhanced acetylation of ATP-citrate lyase promotes the progression of nonalcoholic fatty liver disease. *J. Biol. Chem.* **294**, 11805–11816 (2019).
235. Crettaz, J. *et al.* Intrahepatic injection of adenovirus reduces inflammation and increases gene transfer and therapeutic effect in mice. *Hepatol. Baltim. Md* **44**, 623–632 (2006).
236. Johnston, T. P. & Palmer, W. K. Mechanism of poloxamer 407-induced hypertriglyceridemia in the rat. *Biochem. Pharmacol.* **46**, 1037–1042 (1993).
237. Nakamura, T., Sato, K. & Hamada, H. Reduction of Natural Adenovirus Tropism to the Liver by both Ablation of Fiber-Coxsackievirus and Adenovirus Receptor Interaction and Use of Replaceable Short Fiber. *J. Virol.* **77**, 2512–2521 (2003).
238. Young, S. G. & Zechner, R. Biochemistry and pathophysiology of intravascular and intracellular lipolysis. *Genes Dev.* **27**, 459–484 (2013).
239. Westerterp, M. *et al.* Cholesteryl ester transfer protein decreases high-density lipoprotein and severely aggravates atherosclerosis in APOE*3-Leiden mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **26**, 2552–2559 (2006).
240. Yang, H. *et al.* Cholesterol in LDL receptor recycling and degradation. *Clin. Chim. Acta* **500**, 81–86 (2020).

241. Reynolds, G. D. & St Clair, R. W. A comparative microscopic and biochemical study of the uptake of fluorescent and 125I-labeled lipoproteins by skin fibroblasts, smooth muscle cells, and peritoneal macrophages in culture. *Am. J. Pathol.* **121**, 200–211 (1985).
242. Sullivan, P. M., Mezdour, H., Quarfordt, S. H. & Maeda, N. Type III hyperlipoproteinemia and spontaneous atherosclerosis in mice resulting from gene replacement of mouse Apoe with human Apoe*2. *J. Clin. Invest.* **102**, 130–135 (1998).
243. Weisgraber, K. H., Innerarity, T. L. & Mahley, R. W. Abnormal lipoprotein receptor-binding activity of the human E apoprotein due to cysteine-arginine interchange at a single site. *J. Biol. Chem.* **257**, 2518–2521 (1982).
244. Liu, T., Zhang, L., Joo, D. & Sun, S.-C. NF- κ B signaling in inflammation. *Signal Transduct. Target. Ther.* **2**, 1–9 (2017).
245. Yamaguchi, K. *et al.* Inhibiting triglyceride synthesis improves hepatic steatosis but exacerbates liver damage and fibrosis in obese mice with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*. *Baltim. Md* **45**, 1366–1374 (2007).
246. Ibrahim, M. M. Subcutaneous and visceral adipose tissue: structural and functional differences. *Obes. Rev. Off. J. Int. Assoc. Study Obes.* **11**, 11–18 (2010).
247. van der Veen, J. N. *et al.* The critical role of phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine metabolism in health and disease. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **1859**, 1558–1572 (2017).
248. DeLong, C. J., Shen, Y. J., Thomas, M. J. & Cui, Z. Molecular distinction of phosphatidylcholine synthesis between the CDP-choline pathway and phosphatidylethanolamine methylation pathway. *J. Biol. Chem.* **274**, 29683–29688 (1999).
249. Li, Z. *et al.* The ratio of phosphatidylcholine to phosphatidylethanolamine influences membrane integrity and steatohepatitis. *Cell Metab.* **3**, 321–331 (2006).
250. Nakatsuka, A. *et al.* Insufficiency of phosphatidylethanolamine N-methyltransferase is risk for lean non-alcoholic steatohepatitis. *Sci. Rep.* **6**, 21721 (2016).

251. Wan, S. *et al.* Impaired Hepatic Phosphatidylcholine Synthesis Leads to Cholestasis in Mice Challenged With a High-Fat Diet. *Hepatol. Commun.* **3**, 262–276 (2019).
252. van der Veen, J. N., Lingrell, S. & Vance, D. E. The membrane lipid phosphatidylcholine is an unexpected source of triacylglycerol in the liver. *J. Biol. Chem.* **287**, 23418–23426 (2012).
253. Hur, J. H. *et al.* Phospholipase D1 deficiency in mice causes nonalcoholic fatty liver disease via an autophagy defect. *Sci. Rep.* **6**, 39170 (2016).
254. Kraemer, N. *et al.* Phosphatidylcholine synthesis for lipid droplet expansion is mediated by localized activation of CTP:phosphocholine cytidyltransferase. *Cell Metab.* **14**, 504–515 (2011).
255. Zou, P. & Ting, A. Y. Imaging LDL receptor oligomerization during endocytosis using a co-internalization assay. *ACS Chem. Biol.* **6**, 308–313 (2011).
256. Ikenoya, M. *et al.* A selective ACAT-1 inhibitor, K-604, suppresses fatty streak lesions in fat-fed hamsters without affecting plasma cholesterol levels. *Atherosclerosis* **191**, 290–297 (2007).
257. Ohshiro, T. *et al.* Pyripyropene A, an Acyl-Coenzyme A:Cholesterol Acyltransferase 2-Selective Inhibitor, Attenuates Hypercholesterolemia and Atherosclerosis in Murine Models of Hyperlipidemia. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **31**, 1108–1115 (2011).
258. Kowal, R. C. *et al.* Opposing effects of apolipoproteins E and C on lipoprotein binding to low density lipoprotein receptor-related protein. *J. Biol. Chem.* **265**, 10771–10779 (1990).
259. de Beer, F. *et al.* Apolipoprotein E2 (Lys146-->Gln) causes hypertriglyceridemia due to an apolipoprotein E variant-specific inhibition of lipolysis of very low density lipoproteins-triglycerides. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **20**, 1800–1806 (2000).
260. Huang, Y., Liu, X. Q., Rall, S. C. & Mahley, R. W. Apolipoprotein E2 reduces the low density lipoprotein level in transgenic mice by impairing lipoprotein lipase-mediated lipolysis of triglyceride-rich lipoproteins. *J. Biol. Chem.* **273**, 17483–17490 (1998).
261. Knouff, C. *et al.* Defective VLDL metabolism and severe atherosclerosis in mice expressing human apolipoprotein E isoforms but lacking the LDL receptor. *Biochim. Biophys. Acta* **1684**, 8–17 (2004).

262. van Vlijmen, B. J. *et al.* In the absence of endogenous mouse apolipoprotein E, apolipoprotein E*2(Arg-158 --> Cys) transgenic mice develop more severe hyperlipoproteinemia than apolipoprotein E*3-Leiden transgenic mice. *J. Biol. Chem.* **271**, 30595–30602 (1996).
263. van den Maagdenberg, A. M. *et al.* Transgenic mice carrying the apolipoprotein E3-Leiden gene exhibit hyperlipoproteinemia. *J. Biol. Chem.* **268**, 10540–10545 (1993).
264. van der Veen, J. N. *et al.* Activation of the Liver X Receptor Stimulates Trans-intestinal Excretion of Plasma Cholesterol. *J. Biol. Chem.* **284**, 19211–19219 (2009).
265. Le May, C. *et al.* Transintestinal cholesterol excretion is an active metabolic process modulated by PCSK9 and statin involving ABCB1. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **33**, 1484–1493 (2013).
266. Hirata, A. *et al.* Relationship between non-fasting triglycerides and cardiovascular disease mortality in a 20-year follow-up study of a Japanese general population: NIPPON DATA90. *J. Epidemiol.* (2021) doi:10.2188/jea.JE20200399.
267. Jørgensen, A. B. *et al.* Genetically elevated non-fasting triglycerides and calculated remnant cholesterol as causal risk factors for myocardial infarction. *Eur. Heart J.* **34**, 1826–1833 (2013).
268. Elam, M. B. *et al.* Hepatic gene expression in morbidly obese women: implications for disease susceptibility. *Obes. Silver Spring Md* **17**, 1563–1573 (2009).
269. Gangadharan, B. *et al.* Discovery of novel biomarker candidates for liver fibrosis in hepatitis C patients: a preliminary study. *PloS One* **7**, e39603 (2012).
270. Chee, W.-Y. *et al.* β -catenin-promoted cholesterol metabolism protects against cellular senescence in naked mole-rat cells. *Commun. Biol.* **4**, 357 (2021).
271. Getz, G. S. & Reardon, C. A. Do the Apoe^{-/-} and Ldlr^{-/-} mice yield the same insight on atherogenesis? *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **36**, 1734–1741 (2016).
272. Denechaud, P.-D. *et al.* ChREBP, but not LXRs, is required for the induction of glucose-regulated genes in mouse liver. *J. Clin. Invest.* **118**, 956–964 (2008).
273. Kahn, A. Transcriptional regulation by glucose in the liver. *Biochimie* **79**, 113–118 (1997).

274. Matsumoto, M., Poci, A., Rossetti, L., Depinho, R. A. & Accili, D. Impaired regulation of hepatic glucose production in mice lacking the forkhead transcription factor Foxo1 in liver. *Cell Metab.* **6**, 208–216 (2007).
275. Gordon, S. M. *et al.* A Comparison of the Mouse and Human Lipoproteome: Suitability of the Mouse Model for Studies of Human Lipoproteins. *J. Proteome Res.* **14**, 2686–2695 (2015).
276. Hinsdale, M. E., Sullivan, P. M., Mezdour, H. & Maeda, N. ApoB-48 and apoB-100 differentially influence the expression of type-III hyperlipoproteinemia in APOE*2 mice. *J. Lipid Res.* **43**, 1520–1528 (2002).
277. Haczeyni, F. *et al.* Mouse models of non-alcoholic steatohepatitis: A reflection on recent literature. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **33**, 1312–1320 (2018).

Annexes

Annexe 1 : Communications

Communications orales :

“The Role of Apolipoprotein F in Hepatic Lipid Metabolism”, 8th joint Diabetes and Metabolism Research Symposium, Maastricht, 28 et 29 mai 2018

“Rôle de l’Apolipoprotéine F dans le métabolisme hépatique des lipides », Congrès annuel de la nouvelle société francophone d'athérosclérose, Biarritz, 20 au 22 juin 2018

“Rôle de l’Apolipoprotéine F dans le métabolisme des lipides hépatiques et plasmatiques” (Flash Poster), Congrès annuel de la nouvelle société francophone d'athérosclérose, Biarritz, 19 au 21 juin 2019

Communications affichées :

Deprince A., Haas J., Hennuyer N., Woitrain E., Baugé, E, Lalloyer F., Quemener S., Dombrowicz D., Staels B. « Role of Apolipoprotein F in the control of plasma and hepatic lipid metabolism » Congrès annuel de la nouvelle société francophone d'athérosclérose, Biarritz, 20 au 22 juin 2018

Deprince A., Haas J., Hennuyer N., Woitrain E., Baugé, E, Lalloyer F., Quemener S., Dombrowicz D., Staels B. « Role of Apolipoprotein F in the control of plasma and hepatic lipid metabolism », 5ième symposium EGID "The Gut, Incretin, Diabetes", Lille, 4 décembre 2018

Deprince A., Haas J., Kloosterhuis N., Hennuyer N., Baugé E., Woitrain E., Wolters J.C., Lalloyer F., Quemener S., Dombrowicz D., Kuivenhoven J., van de Sluis B., Staels B. “Role of Apolipoprotein F in the control of plasma and hepatic lipid metabolism », Congrès annuel de la nouvelle société francophone d'athérosclérose, Biarritz, 19 au 21 juin 2019

Annexe 2 : Revue publiée dans Molecular Metabolism⁸¹.

Dysregulated lipid metabolism links NAFLD to cardiovascular disease

Audrey Deprince¹, Joel T. Haas*¹, Bart Staels*¹

Affiliations:

1 Univ. Lille, Inserm, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, U1011- EGID, F-59000 Lille, France.

*These authors contributed equally

Address for Correspondence:

Bart Staels

Institut Pasteur de Lille, 1 rue du professeur Calmette, BP245, 59019 LILLE - France

Tel: +33 320877825 - Fax: +33 320877360

e-mail: bart.staels@pasteur-lille.fr

and

Joel T. Haas

Institut Pasteur de Lille, 1 rue du professeur Calmette, BP245, 59019 LILLE - France

Tel: +33 320877171 - Fax: +33 320877360

e-mail: joel.haas@pasteur-lille.fr

Disclosures Summary: BS is a consultant for Genfit S.A. All other authors have nothing to declare.

Funding Sources:

This work was supported by the French Agence Nationale pour la Recherche (ANR-10-LABX-46 and ANR-16-RHUS-0006). BS is a recipient of an ERC Advanced Grant (694717). AD was supported by a doctoral fellowship from the University of Lille.

Abstract

Background: Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is rapidly becoming a global health problem. Cardiovascular diseases (CVD) are the most common cause of mortality in NAFLD patients. NAFLD and CVD share several common risk factors including obesity, insulin resistance and type 2 diabetes (T2D). Atherogenic dyslipidemia, characterized by plasma hypertriglyceridemia, increased small dense low-density lipoprotein (LDL) particles and decreased high-density lipoprotein-cholesterol (HDL-C) levels, is often observed in NAFLD patients.

Scope of review: In the present review, we highlight recent epidemiological studies evaluating the link between NAFLD and CVD risk. We further focus on recent mechanistic insights into the links between NAFLD and altered lipoprotein metabolism. Finally, we discuss current therapeutic strategies for NAFLD and their potential impact on NAFLD-associated CVD risk.

Major conclusions: Alterations in hepatic lipid and lipoprotein metabolism are major contributing factors for the increased CVD risk in NAFLD patients and many promising NASH therapies in development also improve dyslipidemia in clinical trials.

Introduction

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) prevalence is now estimated at nearly 25% worldwide due to its close association with metabolic disorders, such as obesity and type 2 diabetes (T2D)[1], and it will soon become the most common indication for liver transplantation in the US and Europe. NAFLD encompasses a wide spectrum of liver pathologies ranging from isolated hepatic steatosis (non-alcoholic fatty liver, NAFL) to non-alcoholic steatohepatitis (NASH), which combines steatosis with hepatocyte ballooning and inflammation and favors development of fibrosis[2]. Thus, NAFLD can be divided into three stages with increasing severity: hepatic steatosis, NASH without fibrosis and NASH with fibrosis. Disease progression from steatosis to NASH and fibrosis is heterogeneous and occurs over years or even decades. Consequently, the mechanisms involved in the evolution of NAFLD are still poorly understood. However, numerous lines of evidence point to alterations in hepatic and extra-hepatic lipid metabolism as central drivers [3]. For example, mutations in several genes involved in the control of lipid metabolism (e.g. patatin like phospholipase domain containing 3, PNPLA3[4], transmembrane 6 superfamily member 2, TM6SF2[5], farnesyl-diphosphate farnesyltransferase 1, FDFT1[6], membrane bound O-acyltransferase domain containing 7, MBOAT7[7], etc.) are associated with increased risk of NAFL or NASH.

Importantly, NASH also increases the risk for extra-hepatic complications, especially cardiovascular diseases (CVD), which is the most common cause of death in NASH patients[8]. Indeed, the alterations in hepatic lipid metabolism that lead to NAFLD also drive the development of atherogenic dyslipidemia, especially elevated plasma triglyceride (TG) and remnant lipoprotein cholesterol levels and small dense LDL particles which will infiltrate the arterial wall and promote the development of atherosclerotic plaques. Altered glucose metabolism and insulin resistance, also hallmarks of NAFLD, can further exacerbate CVD risk in these patients. In the present review, we summarize and analyze current data on the

links between NAFLD and CVD with a specific focus on the mechanisms of dyslipidemia and their effect on outcomes for patients with NASH.

I – Epidemiology

Though NAFLD shares many common risk factors with CVD (i.e. obesity, insulin resistance, T2D and atherogenic dyslipidemia), there is emerging evidence that NAFL and NASH directly impact CVD risk. This section will highlight recent studies assessing the relative contributions of insulin resistance, dyslipidemia and inflammation to NAFLD-associated CVD.

NAFLD drives CVD risk independently of obesity, insulin resistance, T2D and atherogenic dyslipidemia

Several recent studies have investigated the risk of fatal and non-fatal cardiovascular (CV) events in cohorts of NAFLD patients, and there is general agreement that all stages of NAFLD (i.e. isolated steatosis, NASH, etc.) can increase the risk of CV events such as myocardial infarction, stroke, revascularization or death. For example, compared to individuals without NAFLD, patients with fatty liver already show an elevated risk for CV events independently of metabolic syndrome risk factors, and this risk further increases when fibrosis is present[9,10]. Surprisingly, even in patients with body mass index (BMI) < 25 kg/m², ultrasound defined-NAFLD is associated with higher incidence of CV events, indicating that NAFLD may act independently of obesity[11]. Importantly, these observations have been partly confirmed in recent meta-analyses. A first meta-analysis of 16 studies showed an increased risk of non-fatal CV events in NAFLD patients compared to those without NAFLD[12]. However, the risk of CVD mortality primarily increased in patients with severe NAFLD, as defined by the concomitant presence of imaging-diagnosed steatosis and elevated gamma-glutamyltranspeptidase (GGT), high NAFLD fibrosis scores (NFS), high hepatic fluoro-deoxyglucose (FDG) uptake, and/or high histological fibrosis stage. A second, smaller meta-analysis[13] generally confirmed these findings, despite methodological weaknesses like inclusion of low numbers of NASH patients (discussed in detail in Liu et al[14]). Surprisingly, a third meta-analysis found increased liver-related, but not CVD, mortality in patients with NAFLD[14].

One major limitation of these studies lies in the diagnostic criteria of NASH. The above described meta-analyses combined studies using a variety of non-invasive diagnostic measures and relatively few patients with histological evaluation of NASH (the current gold standard). Further long-term assessment of larger numbers of histologically diagnosed patients is essential to improve our understanding of the causes of mortality in NASH.

Finally, NASH diagnosis may have resulted in more aggressive management, potentially leading to reduced CVD-related events and mortality[14].

In conclusion, these studies suggest that NAFLD increases the risk of CV events independently of other major CVD risk factors (i.e. dyslipidemia, hypertension, obesity, T2D and insulin resistance) and suggest that other factors link liver to arterial wall pathologies. CV events such as myocardial infarction or stroke are the result of dysfunction of the vascular system leading to atherosclerosis. This raises the question of whether NAFLD increases CVD risk by favoring the development of atherosclerosis.

Association of NAFLD and atherosclerosis

Atherosclerosis, characterized by the development of neo-intimal plaques in large arteries, drives CV events like myocardial infarction and stroke. Atherosclerotic plaques develop progressively over several decades, during which plaque composition changes through distinct processes such as lipid-deposition, inflammation, fibrosis and calcification (reviewed in detail by Libby et al [15]). Evaluation of subclinical atherosclerosis commonly relies on non-invasive detection of plaque features such as lipid deposition, calcification and inflammatory cells. Common methods include measurement of the coronary artery calcification (CAC) score by computed tomography (CT) and estimation of vascular inflammation by FDG position emission tomography (PET). Other methods evaluate plaque size by measurement of carotid intima-media thickness (CIMT) or arterial stiffness by brachial-ankle pulse wave velocity (ba-PWV). Some invasive procedures also exist (e.g. intravascular ultrasonography, optical coherence tomography or invasive angiography), though these are generally not used for initial investigation of atherosclerosis[15]. All these methods have been validated as measuring markers of CV risk.

In line with epidemiological evidence for increased risk for CVD events, several studies demonstrated increased subclinical atherosclerosis in NAFLD patients through the measurement of calcification and aortic stiffness. Cross-sectional studies have shown that ultrasound or magnetic resonance spectroscopy (MRS)-diagnosed NAFLD patients display higher CAC scores than patients without NAFLD[16,17] even among patients with BMI < 25 kg/m²[16]. This was further confirmed in a meta-analysis including 12 studies[18]. Interestingly, the annual rate of CAC progression was significantly higher in participants with ultrasound defined-NAFLD compared to those without NAFLD at baseline, and was further increased in participants with elevated NFS, independently of obesity, hypertension, dyslipidemia and diabetes[19]. CIMT is also increased in patients with NAFLD (diagnosed by ultrasound or CT), independently of dyslipidemia and hypertension[17,20]. Interestingly, a

prospective study showed that increased CIMT and ba-PWV at baseline was associated with higher risk of developing NAFLD (assessed by ultrasound) and ba-PWV was associated with higher likelihood of fibrosis as assessed by the NFS, fibrosis-4 (FIB4) and aspartate transaminase (AST) to platelet ratio index (APRI) scores[21]. This suggests that vascular dysfunction could also drive NAFLD development. However, more studies with bona fide histological assessment of NASH and fibrosis are needed to further explore this hypothesis. Interestingly, some studies failed to find an association between ultrasound-defined NAFLD and subclinical atherosclerosis through the measurement of ba-PWV[20], carotid to femoral (cf-) PWV[22] or CAC-defined calcification (higher CAC cutoff >10)[23] after adjustment for other risk factors.

While most studies focused on coronary artery plaque calcification, an investigation by CT of several locations (i.e. carotid artery, coronary artery, thoracic aorta, iliac artery, renal artery, celiac trunk and superior mesenteric artery) found a positive association of NAFLD (diagnosed by CT) with calcification in the thoracic aorta and celiac trunk but not in the coronary artery[24]. Moreover, this study demonstrated that NAFLD patients are more susceptible to develop multi-arterial calcification. Surprisingly, two studies indicate NAFLD associates with non-calcified plaques, measured by cardiac CT, rather than with calcified plaques, the former possibly being more vulnerable to rupture and subsequent CV events[23,25]. In line, hepatic steatosis (diagnosed by CT or ultrasound) is associated with increased plaque FDG-PET/CT, an indicator of plaque vulnerability[26,27].

In conclusion, the majority of studies indicate that NAFLD increases the risk of atherosclerosis and seems to favor the development of unstable plaques, adding to traditional CV risk factors such as obesity, diabetes, hypertension, dyslipidemia. However, adjustments for systemic inflammation (e.g. by plasma C-reactive protein (CRP) or interleukin 6 (IL-6) levels) have not always been carefully performed. Considering the role of inflammation as a driver of atherosclerosis, future studies should focus on the contribution of inflammation vs other factors in defining the NAFLD-associated increase in CVD risk. Still, genetic evidence points to NAFLD-associated dyslipidemia as an important contributor to elevated CVD risk. Intriguingly, certain genetic polymorphisms favoring the development of NAFLD unexpectedly decrease CVD risk (discussed below).

Genetic variation dissociates NAFLD and CVD incidence

A number of genetic studies have identified variants associated with an increased risk for NAFLD development. Among the most frequent are PNPLA3 rs738409 I148M, which affects remodeling of fatty acid chains in liver TG[28], TM6SF2 rs58542926 E167K, which reduces

hepatic VLDL secretion[5], and MBOAT7 rs641738[7], an enzyme involved in the phospholipid acyl-chain remodeling, with respective minor (risk) allele frequencies of 24%, 7% and 43% (based on CARDIoGRAMplusC4D consortium data[29]). While these variants were identified based on MRS-screened hepatic steatosis, the impact of the PNPLA3 and TM6SF2 variants has been confirmed in histologically diagnosed-NAFLD[30,31]. However, although steatosis in NAFLD is thought to be the result of increased lipogenesis and increased flux of adipose-derived FA[32,33], there are currently no data linking these variants to these pathways.

Given the impact of these variants on hepatic lipid metabolism, their modulatory role on CVD risk has also been investigated. The PNPLA3[34–36] and TM6SF2[34,36–38] NAFLD risk variants are associated with a lower-risk lipoprotein profile characterized by lower plasma TG and/or LDL-C levels. Interestingly, the effect size of the TM6SF2 E167K variant on plasma TG levels is comparable to that of a lipoprotein lipase (LPL) activating variant[34]. This translates into a modest protection of E167K carriers (~5-15% depending on the study) against CVD development[34,39–41]. The effect on CVD risk is less clear for PNPLA3 I148M carriers. Association studies have shown either no effect[29,42–44] or modest protection[34] from coronary artery disease (CAD) when comparing I148M carriers to non-carriers. Two studies that specifically matched for NAFLD presence (by histology or ultrasound) found no protection from CAD in I148M carriers[43,45].

Unexpectedly, genetic polymorphisms associated with NAFLD tend to decrease CVD risk, indicating that high levels of liver fat, by any mechanism, are not sufficient to increase CVD risk. Nevertheless, these findings indicate a role for NAFLD-driven dyslipidemia as an important mediator of elevated CVD risk.

II – Dyslipidemia: linking hepatic lipid metabolism and the heart

There are likely several mechanisms behind the close association between CVD and NAFLD. Insulin resistance is an important driver of NAFLD and especially NASH. It affects several processes, such as dyslipidemia, hyperglycemia, activation of oxidative stress and inflammation, endothelial dysfunction and ectopic lipid accumulation, together creating a pro-atherogenic environment favoring CVD development (reviewed in detail Ormazabal et al.[46]). Additionally, hepatic and circulating immune cell populations are highly correlated in patients with NASH[47] and display alterations comparable to those observed in CVD, suggesting a common immune-inflammatory landscape (reviewed in detail by Gehrke et al[48]).

Atherogenic dyslipidemia, characterized by plasma hypertriglyceridemia, increased small dense LDL particles and decreased HDL-C levels, is variably present in patients with NAFLD[49–52]. The liver plays a central role in lipoprotein metabolism as it participates in the production and/or clearance of all classes of lipoprotein particles. In addition to its role in the metabolism of the lipoprotein particles, the liver is also a major site of metabolism for their substituent triglycerides and, especially, cholesterol. There is consequently an intricate link between hepatic metabolic dysfunction in NAFLD and altered lipoprotein metabolism and composition (Figure 1). Though low HDL-C is a consistent hallmark of NASH in humans, the underlying mechanism driving this effect (and the resultant change in CVD risk) remains an area of active research[53]. In this section, we will focus on recent mechanistic insights into the links between NAFLD and altered VLDL and LDL metabolism.

- **Hepatic TG metabolism and hypertriglyceridemia**

Hepatic de novo lipogenesis drives liver injury in NAFLD

De novo lipogenesis (DNL) is considered an important driver of NAFLD despite relatively low absolute levels of DNL in humans compared to rodents. Hyperinsulinemia in the metabolic syndrome leads to excessive DNL via activation of the liver X receptor alpha - sterol regulatory element-binding protein 1c (LXR α -SREBP1c) cascade[54]. In addition, nutrient signaling through mechanistic target of rapamycin complex 1 (mTORC1) by amino acids, and carbohydrate response element binding protein (ChREBP) by glucose and fructose, can further stimulate this pathway. In physiological states, mTORC1-mediated signaling can compensate for the loss of insulin action[55]. Conversely, when challenged with a high fructose diet, receptor-level ablation of hepatic insulin signaling protects from hepatic steatosis in murine models. Importantly, stable isotope studies have indicated that hepatic DNL is elevated in non-diabetic patients with high intrahepatic TG (measured by MRS)[32,33,56], and is closely associated to altered glucose homeostasis in these patients[56]. These results suggest that hyperinsulinemia (even without overt T2D) likely drives steatosis development in the context of NAFLD.

Whether enhanced DNL is truly detrimental and drives progression to NASH and fibrosis remains a point of debate. During lipogenesis, acetyl-CoA carboxylase (ACC) catalyzes the production of malonyl-CoA, which is subsequently elongated by fatty acid synthase (FASN) into long chain fatty acids, like palmitate (C16:0). In addition to serving as a substrate for lipid synthesis, malonyl-coA reduces fatty acid oxidation by inhibiting carnitine palmitoyltransferase I (CPT1)[57]. DNL is also closely linked with cellular saturated fatty acid levels[58] and ceramide synthesis[54], both of which can lead to hepatocyte apoptosis and

metabolic dysfunction. Conversely, mice lacking hepatic ChREBP, a glucose-induced activator of glycolytic and lipogenic gene expression, showed more pronounced liver damage when challenged with a high-fat high fructose diet[59]. Moreover, hepatic overexpression of PHD finger protein 2 (Phf2), a histone demethylase that mediates some of ChREBP's actions on gene transcription, induced marked steatosis in chow fed mice. However, Phf2-overexpressing mice were protected from steatosis-associated endoplasmic reticulum-stress induced inflammation and hepatic metabolic dysfunction likely due to a fatty acid profile enriched in monounsaturated fatty acid[60]. When challenged with a high fat, high sucrose diet, Phf2 overexpression protected against hepatic inflammation and fibrosis. Thus, ChREBP-Phf2-coordinated regulation of lipogenesis, as well as fatty acid elongation/desaturation plays an important role in maintaining the balance of saturated to unsaturated fatty acid.

Similar findings resulted from human trials with ACC inhibitors. A proof-of-concept study in obese patients with elevated intrahepatic TG as assessed by non-invasive imaging showed that ACC1 and ACC2 inhibition potently and rapidly decreased liver TG content (-36% in 4 weeks)[61]. However, this was associated with elevated plasma TG due to compensatory activation of mitochondrial glycerol-3-phosphate acyltransferase 1 (GPAT1), which is induced by intracellular polyunsaturated fatty acid deficiency[61]. By contrast, elevated DNL observed in patients with high hepatic TG content (~18% measured by MRS) was also associated with increased hepatic VLDL-TG secretion[33]. Thus, increased DNL in NAFLD favors liver fat accumulation by the combination of increased TG synthesis and decreased fatty acid catabolism, but also drives VLDL-TG production, leading to dyslipidemia.

VLDL-TG secretion correlates positively with intrahepatic TG content

VLDL are liver-derived, TG-carrying particles that contribute the majority (by mass) of fasting plasma TG levels. In humans, each VLDL particle contains 1 molecule of the full-length apolipoprotein (Apo) B (ApoB100), whereas intestinally-produced chylomicrons contain the truncated ApoB isoform (ApoB48). Ultracentrifugation isolated VLDL separates in two subclasses (VLDL1 and VLDL2) differing in size and metabolic function. VLDL1 are larger, with higher TG content, while VLDL2 are smaller and denser. Importantly, VLDL1 are reportedly more pro-atherogenic, since they give rise to small dense LDL[62]. Moreover, increased VLDL1, but not VLDL2, particle numbers are observed in overweight diabetic patients, identifying VLDL1 production as a driver of dyslipidemia[62].

NAFLD patients often display hypertriglyceridemia[49–52] and elevated remnant lipoprotein particle concentrations, which are indicative of delayed intravascular TG metabolism[63].

Both features increase cardiovascular risk. Indeed, the risk of major adverse CV events (MACE) inversely correlates with remnant cholesterol levels, with a 0.8 mmol/L reduction of remnant cholesterol levels lowering the risk of MACE by 20%[64]. Intrahepatic TG content directly correlates with hepatic VLDL production in obese non-diabetic patients with normal liver fat content[65,66]. Surprisingly, this direct correlation was lost in patients with intrahepatic TG content above 10% (as assessed by MRS)[65,66]. These results suggest that hepatic VLDL-TG secretion can only compensate for increased liver fat content to a certain extent. Beyond this limit of 10%, it is possible that the correct balance of TG and phospholipids, which coat the VLDL particle (discussed below), can no longer be maintained and VLDL production lags behind further increases in hepatic TG content. In parallel, insulin resistance in more severe steatosis and NASH leads to reduced plasma VLDL clearance (discussed below) which can further exacerbate plasma hypertriglyceridemia. Together, these factors may explain the co-existence of hepatic steatosis and hypertriglyceridemia in NAFLD patients (Figure 2). Importantly, the molar ratio of VLDL-TG (i.e. particle TG content) to VLDL-ApoB100 (i.e. number of particles) is elevated in non-diabetic obese individuals with high intrahepatic TG (measured by MRS), suggesting that the secreted VLDL particles are larger and resemble the pro-atherogenic VLDL1[65]. Since other studies indicate that plasma ApoB concentration is a stronger predictor of CVD risk than LDL-C or plasma TG concentrations[67], further investigation is required to dissect the contribution of ApoB particle concentration vs particle content (i.e. TG or cholesterol) in determining CVD risk. It is important to bear in mind that the majority of the above-referenced studies focus on differences in intrahepatic TG and not necessarily NASH, per se. Moreover, the relative impact of insulin resistance versus elevated intrahepatic TG on hepatic VLDL-TG secretion remains an open question. In insulin-sensitive individuals, insulin inhibits hepatic VLDL production and favors LPL activity, hence decreasing plasma VLDL[46]. However, in NAFLD patients (defined by MRS) hyperinsulinemia increases VLDL-TG secretion[68], indicative of a loss of insulin-dependent inhibition of VLDL production.

Alterations in phospholipid homeostasis may also contribute to altered VLDL regulation in NAFLD. Phosphatidylcholine (PC) and phosphatidylethanolamine (PE) are the major phospholipid components that form the surface monolayer of VLDL (and other) particles. Several studies have shown that PC is crucial for VLDL assembly and secretion[69]. Lowering of PE levels can also reduce VLDL secretion as ~30% of hepatic PC production comes from the conversion of PE to PC by phosphatidylethanolamine N-methyltransferase (PEMT)[70]. Moreover, a decreased PC/PE ratio[71] and lower levels of PEMT[72] were observed in patients with NASH. Likewise, diets that reduce PC availability, such as the methionine- and choline-deficient diet, reduce hepatic VLDL-TG secretion and are commonly

used to induce features of NAFLD in mice. Studies in mice indicate that in addition to steatosis, reduced PC availability may also contribute to hepatic injury in NASH. For example, high fat diet (HFD)-fed PEMT-deficient mice develop more severe hepatic inflammation and fibrosis, likely due to development of cholestasis[73]. Similarly, patients with histological NASH and methionine- and choline-deficient-fed mice [74] displayed increased hepatic glutaminase 1 (GLS1), which associated with reduced PC synthesis. Inhibition of GLS1 in the methionine and choline-deficient diet mouse model reduced oxidative stress by limiting anaplerotic reactions for the tricarboxylic acid (TCA) cycle. By reducing oxidative stress, serine was used preferentially in the 1 carbon cycle to generate methyl donors for use in the conversion of PE to PC and VLDL-TG output was consequently restored [74]. This study provides evidence that oxidative stress induced by hepatic lipid overload could indirectly impact the PC/PE balance, impacting hepatic VLDL-TG output (Figure 2). Together, these results highlight important links between phospholipid metabolism, amino acid metabolism and oxidative stress in the development of NAFLD-associated dyslipidemia.

Reduced plasma VLDL clearance results in the accumulation of remnant particles in NAFLD

While hepatic VLDL output is increased in NAFLD, triglyceride-rich lipoprotein (TRL--i.e. VLDL and chylomicron remnants) clearance is reduced, further exacerbating hypertriglyceridemia in these patients. Circulating TRLs are metabolized by LPL to deliver fatty acids to peripheral tissues. Importantly, several exchangeable apolipoproteins modulate LPL activity, including ApoC2 and ApoA5, which stimulate, and ApoC1, ApoC3 and ApoE, which inhibit LPL activity. Additionally, angiopoietin-like proteins (ANGPTL)3 and ANGPTL4 also inhibit LPL individually, and particularly when complexed with ANGPTL8[75].

Elevated non-fasting plasma TG and remnant cholesterol levels (defined as total cholesterol-LDL-C - HDL-C) due to genetic ApoA5 polymorphisms causally increased the risk of myocardial infarction (independently of hypertension and T2D)[76]. Moreover, loss of function mutations in ApoC3[77,78] and ANGPTL4[79] decreased plasma TG and CVD risk. In line, decreased plasma levels of ANGPTL8[80] and ANGPTL3[81] are both associated with decreased CVD risk (defined by the presence of atherosclerotic plaques or myocardial infarction). On the contrary, decreased plasma ANGPTL4, which is transcriptionally activated by peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) α , was also associated with carotid artery stenosis (vessel wall thickness measured by magnetic resonance imaging, MRI)[82], suggesting increased CVD risk. In ApoE*3-Leiden mice, ANGPTL4 overexpression

decreased foam cell formation and protected against atherosclerosis formation via lipid-independent anti-inflammatory effects[82].

Whereas ApoC3 variants clearly impact plasma TG levels, they do not seem to have a consistent effect on hepatic steatosis [83–87]. In line, overexpression of ApoC3 in HFD-fed mice did not change steatosis, despite markedly elevating plasma triglycerides due to impaired TG clearance[88]. Thus, ApoC3 more likely plays a role in the NAFLD-associated dyslipidemia. Mechanistically, ApoC3 is transcriptionally activated by glucose[89], and repressed by PPAR α , itself reduced in patients with NASH[90]. Since ApoC3-mediated clearance explains ~75% of plasma TG variation in obese non-diabetic patients[91], these findings support the idea that NAFLD favors increased ApoC3 transcription, hence suppressing TRL clearance.

Several studies have observed elevated ANGPTL protein levels in NAFLD patients. Plasma ANGPTL3 levels are higher in biopsy-proven NASH patients[92,93], and plasma[94,95] and hepatic[96] ANGPTL8 are elevated in patients with fatty liver independently of insulin resistance[94]. In addition to inhibiting LPL activity, ANGPTL8 seems to favor TG accumulation in hepatocytes. In vitro, ANGPTL8 knockdown decreased TG accumulation in hepatocytes after fatty acid treatment[96], whereas incubation of hepatocytes with recombinant ANGPTL8 increased TG accumulation likely due to decreased activity of adipose triglyceride lipase (ATGL)[97]. Overall, several regulators of LPL activity are perturbed in patients with NAFLD, which may contribute to increase the risk of CVD.

After TG lipolysis, TG-poor VLDL become remnant particles enriched in cholesterol[98]. Ultrasound-diagnosed NAFLD patients displayed higher fasting remnant cholesterol concentrations, indicating impaired clearance of remnant particles. Moreover, NAFLD patients with above-median concentrations of remnant cholesterol display higher CV event rates compared to NAFLD patients with below-median concentration of remnant particles[99]. Indeed, like LDL, remnant particles can cross the arterial wall[100]. NAFLD patients also display elevated levels of small dense LDL particles, which are more atherogenic than large buoyant LDL[51,101]. Moreover, NAFL patients (defined by ultrasound or biopsy) display higher activity of cholesteryl ester transfer protein (CETP), an enzyme which exchanges cholesterol between HDL and ApoB-particles thereby favoring the formation of small dense LDL[102,103]. Together, these changes lead to increased abundance and altered metabolism of TRL which are a major contributor to CVD risk in NAFLD.

- **Intracellular cholesterol metabolism and elevated plasma LDL-C**

Lipid-lowering therapy

Statins have been investigated as a potential therapy for NASH due to their actions in correcting plasma total and LDL-C levels and subsequent CVD-risk reduction. Initial studies using indirect measures of NAFLD showed promising results, i.e. decreased alanine transaminase (ALT) and AST levels or reduced steatosis at ultrasound[104]. However, randomized trials evaluating the impact of statin therapy on biopsy-proven NASH are lacking[105]. A post-hoc analysis of a randomized, placebo-controlled trial assessing pioglitazone in NASH revealed that patients on statin therapy either at enrollment or starting therapy during the trial displayed lower plasma ALT and liver fat content on MRS[106]. However, histological analysis did not show statistically significant improvements in steatosis, inflammation, ballooning, nor fibrosis[106]. Very surprisingly, the use of lipid-lowering agents (statins or other lipid-lowering agents) was reported not to reduce CV mortality in NAFLD patients[107]. However, the groups in this study were not well matched for other co-morbidities increasing CVD risk (i.e. T2D, history of CVD), which could mask a potential beneficial effect of lipid-lowering therapy on CVD risk. Finally, a transcriptomic analysis of liver biopsies from obese patients revealed that statin treatment is associated with increased expression of genes involved in DNL[108]. Altogether, while statins are clearly safe drugs to use in NAFLD patients, whether they also improve NAFLD is doubtful.

Receptor-mediated LDL clearance

Unlike mice, humans metabolize the majority of their VLDL particles to LDL. Elevated concentrations of LDL-C, an undisputed CVD risk factor, are often, but not always, observed in NAFLD patients[50,52]. Several cell surface receptors facilitate the removal of LDL and remnant lipoprotein particles from the circulation by the liver, the best characterized being the LDL receptor (LDLR) and the closely related LDLR related-protein 1 (LRP1). However, LDLR is negatively regulated by proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9), a protease whose best-known function is to bind LDLR at the plasma membrane. Upon binding, PCSK9 promotes intracellular degradation of LDLR by blocking its recycling in the endosomal compartment. This leads to reduced LDLR presence at the plasma membrane and less LDL uptake as a consequence. Regulation of LDLR activity by PCSK9 has been shown to impact CVD. Several studies showed dysregulated levels of these proteins in NAFLD. Plasma levels of PCSK9 positively correlated with histological hepatic steatosis[109,110], whereas low levels of hepatic LRP1 expression are associated with poor prognosis in hepatocellular carcinoma, an outcome of NAFLD[111].

Recent pre-clinical studies suggest that PCSK9 and LRP1 could modulate NAFLD pathogenesis. PCSK9 deficiency exacerbated the development of hepatic steatosis in HFD-fed mice[112]. Moreover, hepatic steatosis decreased cell-surface LDLR expression and increased plasma ApoB and total cholesterol in a PCSK9-dependent manner [110]. Indeed, increased intracellular lipid induces endoplasmic reticulum stress which can activate sterol regulatory element-binding protein 2 (SREBP2), a transcriptional regulator of PCSK9 expression[110]. These results point the dual role of PCSK9. By decreasing cholesterol uptake through LDLR inhibition, PCSK9 protects the liver from excess intrahepatic cholesterol accumulation. However, this leads to increased plasma LDL-C levels, and hence increased CVD risk.

High-fat high-cholesterol diet-fed liver-specific LRP1-deficient mice showed accelerated NAFLD development characterized by increased steatosis, inflammation and fibrosis, independent of any changes in plasma lipids[113]. Worsening of NAFLD was attributed to a marked increase in hepatic cholesterol in the liver-specific LRP1-deficient mice, associated with increased cell death and stellate cell activation[113]. The lack of effect on plasma lipoproteins in this model was surprising, but is not consistent across all murine models. For example, hepatocyte LRP1 deficiency increased atherosclerosis severity in ApoE/LDLR double knockout mice despite decreased plasma cholesterol levels[114]. Collectively, these data suggest that dysregulation of receptors mediating hepatic LDL-C uptake induces liver injury by increasing intrahepatic cholesterol. Moreover, insulin signaling strongly induces LRP1 translocation to the membrane highlighting a further mechanism by which insulin resistance could contribute to remnant accumulation observed in NAFLD patients[115].

Dysregulation of intracellular cholesterol metabolism is also associated with NASH severity in humans and excess dietary cholesterol drives hepatic inflammation in murine models of NASH[116]. The mechanisms underlying these findings are likely complex. Intracellular cholesterol regulates gene transcription directly via suppression of SREBP2 activity, or indirectly via activation of LXRs and farnesoid X receptor (FXR) by cholesterol-derived metabolites (oxysterols and bile acids, respectively). Moreover, the transcriptional regulator tafazzin (TAZ) has been identified as another cholesterol-sensitive pathway implicated in NASH progression[117]. Excess intracellular cholesterol stabilizes TAZ, which in turn activates expression of pro-fibrotic genes in hepatocytes. In line, in vitro studies showed that increased intracellular cholesterol as a result of LDL loading provoked mitochondrial injury and induced several signs of lipotoxicity such as apoptosis, necrosis and oxidative stress[118]. These studies highlight an important role of alterations in intracellular cholesterol homeostasis as a driver of NASH.

III - Therapeutic strategies and their potential impact on CVD risk in NAFLD

- ***Lifestyle intervention and bariatric surgery to treat NAFLD: impact on CVD risk factors***

Lifestyle intervention

Lifestyle interventions such as diet modification and increased physical activity are cornerstones in the prevention and treatment of NAFLD. Several strategies of dietary intervention have been tested: modification of diet composition (e.g. Mediterranean, low-carbohydrate, low-fat, and ketogenic diets) or feeding behavior (i.e. time restricted feeding or intermittent fasting) with the mediterranean diet showing the most promising results for reducing hepatic steatosis, dyslipidemia and other metabolic comorbidities (reviewed by Saeed et al.)[119]. A recent study of overweight and obese patients showed that consumption of a ketogenic diet reduced intrahepatic fat content (measured by MRS) and markedly increased hepatic mitochondrial activity[120]. This was paralleled by 25% reduction of plasma TG levels and improved insulin sensitivity, despite minimal (~3%) weight loss. Similarly, in NAFLD patients, 2 weeks of a low carbohydrate diet also strongly decreased liver fat (assessed by MRS) associated with decreased hepatic DNL, increased mitochondrial β -oxidation, ~50% reduced VLDL-TG, improved insulin sensitivity and decreased plasma IL-6 and tumor necrosis factor α (TNF- α) levels despite an only modest weight loss (~2%)[121].

Increasing physical activity has also shown promise in treating NAFLD and associated comorbidities. High-intensity interval training improved several metabolic parameters including liver fat content (measured by MRI), BMI, plasma lipids and insulin resistance in obese NAFLD patients (diagnosed by ultrasound or CT) with T2D[122]. Similarly, supervised exercise training, including a combination of aerobic and resistance training, effectively decreased body weight, hepatic steatosis and adipose depot size (measured by MRI) when compared to standard lifestyle advice[123]. Moreover, these changes were accompanied by improvements in several CVD risk parameters, including decreased plasma LDL-C, increased clearance of large TG-rich VLDL1 particles, improvement of insulin sensitivity, and reduced arterial stiffness[123].

Overall, these studies indicate that short-term reductions in liver fat and improvements in CVD risk factors can be achieved independently of weight loss. However, more significant weight loss (>7%) is needed to achieve resolution of biopsy-proven NASH[124,125], and fibrosis regression was observed only after $\geq 10\%$ weight loss[124]. Future studies should

address whether dietary interventions, like ketogenic or mediterranean diets lead to durable reductions in NASH and CVD events with or without significant weight loss.

Bariatric surgery

Bariatric surgery is highly effective in treating hepatic steatosis and NASH, as an alternative to diet and exercise, especially in the context of severe and morbid obesity. Bariatric surgery refers to several types of surgical interventions that mechanically restrict food intake, including gastric bypass (most commonly Roux-en-Y, RYGB), gastric banding and sleeve gastrectomy. Gastric bypass and gastric banding have been shown to significantly improve histological features of NASH one[126] and five[127] years after the intervention and progressively decrease histological fibrosis in NASH patients[128]. Gastric bypass was the most efficient procedure to improve NASH[126], correlating with the degree of weight loss. Both studies also found durable improvements in dyslipidemia, insulin resistance and markers of systemic inflammation, indicating that CVD risk may also be reduced. Histological improvements of NASH (steatosis, inflammation and fibrosis) after RYGB or gastric banding have been confirmed in several smaller studies with median follow up varying from 6 months[129,130] to 40 months[129,130].

Prior to studies on NASH, bariatric surgery was found to rapidly and markedly improve several CVD risk factors, especially insulin resistance and dyslipidemia (reviewed by Tailleux et al)[132]. A 12-year follow up study demonstrated that RYGB is associated with persistent weight loss, T2D remission, increased HDL-C, decreased LDL-C and plasma TG compared to obese patients not undergoing surgical intervention for weight loss[133]. Importantly, bariatric surgery also reduced CVD events and mortality[134] among T2D and obese patients. It is, therefore, highly likely that bariatric surgery will also reduce CV events in severely and morbidly obese patients with NASH, though this remains to be directly proven. Moreover, despite these benefits, bariatric surgery is not without risks[135] and is unlikely to become a universal treatment for metabolic diseases, including NAFLD.

- **Potential impact of pharmacological interventions targeting NASH on CVD risk**

There are currently no approved pharmacological therapies for NASH. However, several clinical phase 2 and phase 3 trials assessing metabolically oriented strategies are ongoing (Figure 1). Many of these therapies are nuclear receptor agonists or hormone analogs which mainly stimulate metabolic pathways to reduce hepatic fat accumulation and decrease liver injury. Interestingly, the majority of these compounds also showed athero-protection in pre-clinical studies. In this chapter, we highlight the current advancement of selected clinical

trials for NASH and report specifically on associated effects on dyslipidemia and CVD risk reduction when data are available.

Bile acid metabolism modulators

FXR agonists

FXR is a nuclear receptor activated by bile acids that is highly expressed in the enterohepatic system. In addition to suppressing bile acid synthesis, FXR activation protects against lipid accumulation in the liver by decreasing hepatic lipogenesis, favoring fatty acid oxidation, as well as decreasing inflammation through repression of nuclear factor kappa B (NF- κ B) signaling[136].

Obeticholic acid (OCA) is a semi-synthetic steroidal FXR agonist. Phase 2 (FLINT) and phase 3 (REGENERATE) trial data indicate that OCA treatment improves fibrosis without worsening of NASH (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02548351). However, complete NASH resolution was not achieved. Unfortunately, these benefits are associated with an increase in LDL-C by approximately 20 mg/dL[137,138], increasing the CVD risk score category from low or medium to high risk in 7.6% of patients[139]. Detailed lipoprotein profile analysis in the FLINT trial patients, revealed that OCA treatment increased both large buoyant (less atherogenic) and small dense (more atherogenic) LDL particles. Moreover, despite similar total VLDL levels, OCA-treated patients displayed a shift from large VLDL1 toward less atherogenic small VLDL2 particles[140]. Importantly, the OCA-induced LDL-C increase was reversed by concomitant treatment with statins[138,141]. This finding suggests that the OCA-associated increase in LDL-C likely results from FXR-mediated reduction of cytochrome P450 family 7 subfamily A member 1 (CYP7A1) expression in hepatocytes, leading to decreased conversion of intrahepatic cholesterol to bile acids. Increased intrahepatic cholesterol represses the statin-sensitive SREBP2 pathway thereby reducing LDLR transcription and decreasing plasma LDL clearance[136].

Several other synthetic FXR agonists with potential selective modulator actions are currently being evaluated in phase 2 clinical trials enrolling patients with NASH. One such compound, cilofexor (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02854605), an intestinally-targeted, non-steroidal FXR agonist, decreases hepatic steatosis (assessed by MRI) without increasing LDL-C[142]. Further studies should address whether these novel FXR agonists impact also on CVD risk.

Agonism of the FXR pathways has potential for the treatment of fibrotic-NASH, but the current class of compounds likely needs refinement to improve the metabolic and CV risk profile. Indeed, FXR activation favors reverse cholesterol transport, reduces VLDL secretion

and decreases lipoprotein (Lp) (a) levels, but also increases plasma LDL-C by decreasing bile acid synthesis, (which leads to decreased LDLR expression) and increasing CETP expression[136].

Fibroblast growth factor 19 analogs

The non-tumorigenic fibroblast growth factor (FGF) 19 analog NGM282 is also under evaluation for NASH treatment (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02443116). FGF19, a hormone produced by the distal intestine and FXR target gene, participates in a feedback loop to reduce bile acid synthesis. FGF19 also exerts metabolic actions which may be beneficial against NAFLD such as lowering liver TG and reducing plasma TG levels[143]. Interestingly, circulating FGF19 is decreased in NASH patients, providing further therapeutic rationale[144].

In two 12-week trials, NGM282 improved all histological parameters of NASH and fibrosis and reduced ALT and AST[145,146]. However, as with OCA, NGM282 treatment increased plasma LDL-C[145], mostly as large, buoyant LDL particles[147]. Plasma TG levels decreased[145] as a result of fewer large VLDL particles[147]. The net effect of these changes on CVD risk remains unclear. Pre-clinical studies in ApoE deficient mice demonstrated a clear athero-protective action of NGM282[148]. In humans, FGF19 levels correlated negatively with CAD (defined by coronary angiography) independently of BMI, hypertension, dyslipidemia and diabetes[149]. As with OCA, increased plasma LDL-C was blunted by statin treatment[146,147] suggesting that the action mechanism of NGM282 is similar as OCA. Larger phase 3 trials are ongoing.

Future directions for treatments targeting the bile acid pathways

Volixibat (an intestinal ASBT inhibitor, that prevents reabsorption of bile acids) decreased plasma total cholesterol and LDL-C, but did not improve NASH in interim analysis from a phase 2 trial (Clinical trial identifier: NCT02787304)[150]. Finally, bile acid sequestrants, such as colestevlam and cholestyramine, improve glucose metabolism in T2D and lower CV risk (WHO trial) without improving liver histology (clinicaltrials.gov Identifier: NCT01066364)[151]. Therefore, intra-vascular cholesterol and lipid metabolism appear regulated in a dissociated manner from liver histological NAFLD.

PPAR agonists

There are currently several clinical trials assessing agonists of different members of the PPAR family for the treatment of NASH. This family is composed of three isoforms, PPAR α ,

PPAR β (or PPAR δ) and PPAR γ , which have distinct and partially overlapping functions in the control of lipid and glucose metabolism (for a detailed review see Dubois et al [152]). Each PPAR isoform can be specifically activated by appropriately designed synthetic agonists. For example, fibrates (PPAR α agonists) and thiazolidinediones (TZDs, PPAR γ agonists) are used in the treatment of hyperlipidemia and diabetes, respectively.

Single PPAR agonists

Since, hepatic PPAR α expression is downregulated in NASH and restoration of PPAR α activity is observed upon NASH resolution[90], activation of this pathway appears as a reasonable approach to treat NASH. Fibrates (e.g. fenofibrate, gemfibrozil, pemafibrate, etc.) mainly target PPAR α and thereby improve atherogenic dyslipidemia observed in obesity, T2D and NAFLD. Pre-statin era and post-hoc analysis of the FIELD and ACCORD studies indicate a reduction of CV risk especially in the high TG/low HDL-C subpopulations[153]. Several small studies have found poor efficacy for older fibrates (i.e. fenofibrate, gemfibrozil, clofibrate) on histological improvements for NASH, despite correction of dyslipidemia[154]. Pemafibrate, a new PPAR α agonist, is currently being evaluated for CV risk in the PROMINENT trial (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT03071692). Studies in NASH assessed by non-invasive methods (MRI for steatosis, FIB4, NFS and enhanced liver fibrosis (ELF) tests) are underway.

Thiazolidinediones (TZD), such as pioglitazone and rosiglitazone, are PPAR γ agonists used in T2D patients to increase peripheral insulin sensitivity. Because of the strong interaction between diabetes and NAFLD, several trials tested their ability to improve NASH. A meta-analysis of 8 randomized clinical trials evaluating pioglitazone and rosiglitazone therapy on biopsy-proven NASH revealed that pioglitazone, but not rosiglitazone, promotes NASH resolution and reduces liver fibrosis[155]. Whereas rosiglitazone treatment reduces steatosis and plasma ALT, it did not improve lobular inflammation, ballooning nor fibrosis[156,157]. Conversely, pioglitazone improved all histological features of NASH and fibrosis including an improvement of dyslipidemia[158–160]. Pioglitazone is also superior to rosiglitazone in terms of CVD risk reduction in T2D patients. Rosiglitazone increases plasma LDL-C and HDL-C levels[161], whereas pioglitazone improves dyslipidemia by increasing plasma HDL-C levels and decreasing plasma TG levels without raising LDL-C[162] or increasing large, buoyant LDL[161,163]. While long-term rosiglitazone treatment of T2D patients may slightly increase the risk for myocardial infarction[164], pioglitazone rather decreases the risk of MACE (although the risk of heart failure increases with all glitazones)[165,166]. In biopsy-proven NASH patients, rosiglitazone treatment did not modify plasma TG or HDL-C levels, but increased LDL-C[156]. Conversely, pioglitazone treatment resulted in similar plasma lipid

improvements in biopsy-proven NASH patients as observed in patients with T2D[159,167]. In the PIVENS trial, pioglitazone reduced plasma TG levels and VLDL particle size, while plasma HDL-C and LDL particle size increased, especially in patients with NASH resolution [168,169], further underscoring the close association between NASH and atherogenic dyslipidemia. These different effects of rosiglitazone and pioglitazone may be due to the fact that pioglitazone also activates PPAR α [170,171]. Thus, whereas selective PPAR γ activators may reduce steatosis by lowering adipose-liver free fatty acid flux as a result of enhanced insulin sensitivity, pioglitazone's additional beneficial effects on inflammation and fibrosis may be a result of its modest activation of PPAR α .

Seladelpar is a PPAR δ agonist analyzed in a phase 2 clinical trial (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT03551522). Importantly, these trials were prematurely stopped after interim analysis due to the presence of abnormal hepatic inflammation during interim analysis, reportedly unrelated to seladelpar treatment, despite improvements in liver function biomarkers. Another trial in patients with mixed dyslipidemia showed that seladelpar decreases plasma LDL-C and TG and increases HDL-C levels. Improvements in insulin sensitivity and plasma levels of alkaline phosphatase and GGT, markers of liver injury, were also observed in seladelpar-treated patients[172].

Dual and pan-PPAR agonists

Different dual and triple PPAR agonists, which leverage the complementary actions of each PPAR isoform, are also being evaluated for NASH. Elafibranor is a dual PPAR α/δ agonist which in a phase 2b study demonstrated improvements in histological ballooning and lobular inflammation without worsening of fibrosis, benefits which were most apparent in patients with more severe NASH at baseline (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01694849)[173]. Improvements in insulin sensitivity and decreased systemic inflammation markers (measured by CRP, fibrinogen, haptoglobin) were also observed in elafibranor-treated patients. Decreases in plasma TG and LDL-C were observed with concomitant increases in HDL-C, even among patients treated with statins. However, recently reported interim phase 3 results did not show statistically significant differences in resolution of NASH between elafibranor and placebo. Long-term evaluation of CVD risk reduction by elafibranor in NASH patients has not been evaluated yet.

Saroglitazar is a dual PPAR α/γ agonist currently in phase 3 clinical trials in the US and Europe (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT03061721), and already approved for the treatment of NASH in India. Lanifibranor is a triple PPAR $\alpha/\gamma/\delta$ agonists which was recently reported to reach the primary and secondary endpoints by significantly decreasing the Steatosis Activity

Fibrosis Score (SAF), inducing NASH resolution and lowering fibrosis in the NATIVE phase 2b trial (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT03008070). Pre-clinical results indicate that saroglitazar decreases plasma TG levels, reduces hepatic steatosis, ballooning and inflammation in the choline-deficient, L-amino acid-defined, high-fat diet NASH mouse model and protects against carbon tetrachloride (CCl₄)-induced fibrosis[174], whereas lanifibranor treatment decreases CCl₄-induced hepatic fibrosis, plasma glucose and TG levels in db/db mice[175].

FGF21 analog

FGF21, a hepatokine and PPAR α target gene, displays many favorable metabolic actions, including enhancing fatty acid oxidation, reducing lipogenesis and improving dyslipidemia and insulin sensitivity[176]. Accordingly, a recombinant analog of human FGF21, pegbelfermin (ClinicalTrials.gov, Identifier: NCT02413372), reduced hepatic fat (assessed by MRI) and plasma transaminases and improved dyslipidemia (reduced plasma TG and LDL-C and increased HDL-C), in a phase 2 study of biopsy-diagnosed NASH patients (no post-treatment biopsy was performed)[177]. In ApoE deficient mice, FGF21 protects against atherosclerosis progression acting on several pathways, e.g. by reducing plasma cholesterol levels and cholesterol biosynthesis in the liver and reducing apoptosis in the aortic roots[178,179].

Thyroid hormone receptor β agonists

Thyroid hormones (TH) regulate several pathways of hepatic lipid metabolism mainly through TH receptor β (TR- β), the major isoform in the liver. In NAFLD, TR- β activation induces fatty acid uptake and oxidation and enhances mitochondrial biogenesis and activity. TR- β agonism also favors LDLR-mediated endocytosis and reverse cholesterol transport[180]. At least two TR- β selective agonists are under investigation for NASH, resmetirom (ClinicalTrials.gov, Identifier: NCT02912260) and VK2809 (ClinicalTrials.gov, Identifier: NCT04173065) employing distinct pharmacological mechanisms for liver selectivity. Resmetirom treatment decreased liver fat content (assessed by MRI) and NAS on biopsy in patients with biopsy-proven NASH with fibrosis (stages 1 to 3)[181]. Moreover, resmetirom treatment improved dyslipidemia by decreasing plasma levels of TG, ApoB, Lp(a), ApoCIII and LDL-C especially reducing the proportion of small LDL and large VLDL[181]. Thus, TR- β activation reduces both liver fat content and plasma lipid CVD risk factors, which may result in improved CV function.

Other treatments in clinical trials

The glucagon-like peptide-1 (GLP1) analog liraglutide, used for T2D treatment, has shown promise for NASH treatment with improvements in body weight and glycaemic control in 9 biopsy-proven NASH patients (ClinicalTrials.gov, Identifier: NCT01237119)[182], prompting confirmation in larger studies with histological endpoints. Interestingly, the GLP1 receptor (GLP1-R) agonists liraglutide[183] and semaglutide[184] both reduce CVD risk in T2D patients. Considering the lack of GLP1-R expression in hepatocytes, it is unclear how GLP1 analogs improve NAFLD (either through non-parenchymal actions on the liver or through enhancing systemic insulin sensitivity and weight loss). In western diet-fed ApoE or LDLR-deficient mice, both liraglutide and semaglutide decrease atherosclerosis through anti-inflammatory effects, independently of cholesterol lowering and weight loss[185]. Moreover, GLP1 may prevent macrophage foam cell formation[186]. In high fat diet-fed ApoE*3-Leiden CETP-transgenic mice, GLP1-R agonist treatment decreased hepatic steatosis and plasma TG by respectively decreasing DNL and VLDL production[187].

Several drugs in development target the increase in DNL observed in NASH patients[32]. Recent phase 2 studies with the ACC1/ACC2 inhibitor firsocostat showed reduced hepatic steatosis, but increased plasma VLDL particles and TG levels (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02856555)[188]. Thus, despite improvement of hepatic steatosis, firsocostat may increase CVD risk by increasing the amount of atherogenic particles.

In conclusion, several therapeutic strategies for NAFLD with evidence or potential for CVD protection, are emerging. However, a detailed assessment of CV outcomes (MACE, subclinical atherosclerosis) is lacking, and, in several short-term studies, changes in plasma lipid profiles are unreported. More importantly, the efficacy of these therapies on NASH remains to be demonstrated. Nevertheless, it remains a major challenge to identify those NASH patients at highest risk for CVD and to appropriately target them for management.

Conclusion

NAFLD is closely associated with CVD. While epidemiological studies do not consistently show increased CVD mortality in NAFLD patients, there is clear evidence for increased (non-fatal) MACE. Alterations in lipid and lipoprotein metabolism are major contributing factors linking NAFLD to CVD. Moreover, many promising NASH therapies in development also improve dyslipidemia in clinical trials. Given the current lack of approved pharmacological therapies for NASH, a clear understanding of the underlying factors that drive elevated CVD risk in NAFLD will be critical to the effective care and management of this growing patient population.

References

- [1] Younossi, Z.M., Koenig, A.B., Abdelatif, D., Fazel, Y., Henry, L., Wymer, M., 2016. Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease-Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology (Baltimore, Md.)* 64(1): 73–84.
- [2] Haas, J.T., Francque, S., Staels, B., 2016. Pathophysiology and Mechanisms of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Annual Review of Physiology* 78: 181–205.
- [3] Eslam, M., Sanyal, A.J., George, J., International Consensus Panel, 2020. MAFLD: A Consensus-Driven Proposed Nomenclature for Metabolic Associated Fatty Liver Disease. *Gastroenterology* 158(7): 1999–2014.
- [4] Romeo, S., Kozlitina, J., Xing, C., Pertsemlidis, A., Cox, D., Pennacchio, L.A., et al., 2008. Genetic variation in PNPLA3 confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease. *Nature Genetics* 40(12): 1461–5.
- [5] Kozlitina, J., Smagris, E., Stender, S., Nordestgaard, B.G., Zhou, H.H., Tybjærg-Hansen, A., et al., 2014. Exome-wide association study identifies a TM6SF2 variant that confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease. *Nature Genetics* 46(4): 352–6.
- [6] Chalasani, N., Guo, X., Loomba, R., Goodarzi, M.O., Haritunians, T., Kwon, S., et al., 2010. Genome-wide association study identifies variants associated with histologic features of nonalcoholic Fatty liver disease. *Gastroenterology* 139(5): 1567–76, 1576.e1-6.
- [7] Mancina, R.M., Dongiovanni, P., Petta, S., Pingitore, P., Meroni, M., Rametta, R., et al., 2016. The MBOAT7-TMC4 Variant rs641738 Increases Risk of Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Individuals of European Descent. *Gastroenterology* 150(5): 1219-1230.e6.
- [8] Mantovani, A., Scorletti, E., Mosca, A., Alisi, A., Byrne, C.D., Targher, G., 2020. Complications, morbidity and mortality of nonalcoholic fatty liver disease. *Metabolism: Clinical and Experimental* [Epub ahead of print].
- [9] Baratta, F., Pastori, D., Angelico, F., Balla, A., Paganini, A.M., Cocomello, N., et al., 2019. Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Fibrosis Associated With Increased Risk of Cardiovascular Events in a Prospective Study. *Clinical Gastroenterology and Hepatology: The Official Clinical Practice Journal of the American Gastroenterological Association* 18(10): 2324–31.
- [10] Sinn, D.H., Kang, D., Chang, Y., Ryu, S., Cho, S.J., Paik, S.W., et al., 2020. Non-alcoholic fatty liver disease and the incidence of myocardial infarction: A cohort study. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 35(5): 833–9.
- [11] Yoshitaka, H., Hamaguchi, M., Kojima, T., Fukuda, T., Ohbora, A., Fukui, M., 2017. Nonoverweight nonalcoholic fatty liver disease and incident cardiovascular disease: A post hoc analysis of a cohort study. *Medicine* 96(18): e6712.
- [12] Targher, G., Byrne, C.D., Lonardo, A., Zoppini, G., Barbui, C., 2016. Non-alcoholic fatty liver disease and risk of incident cardiovascular disease: A meta-analysis. *Journal of Hepatology* 65(3): 589–600.
- [13] Wu, S., Wu, F., Ding, Y., Hou, J., Bi, J., Zhang, Z., 2016. Association of non-alcoholic fatty liver disease with major adverse cardiovascular events: A systematic review and meta-analysis. *Scientific Reports* 6: 33386.
- [14] Liu, Y., Zhong, G.-C., Tan, H.-Y., Hao, F.-B., Hu, J.-J., 2019. Nonalcoholic fatty liver disease and mortality from all causes, cardiovascular disease, and cancer: a meta-analysis. *Scientific Reports* 9(1): 11124.
- [15] Libby, P., Buring, J.E., Badimon, L., Hansson, G.K., Deanfield, J., Bittencourt, M.S., et al., 2019. Atherosclerosis. *Nature Reviews. Disease Primers* 5(1): 56.

- [16] Chang, Y., Ryu, S., Sung, K.-C., Cho, Y.K., Sung, E., Kim, H.-N., et al., 2019. Alcoholic and non-alcoholic fatty liver disease and associations with coronary artery calcification: evidence from the Kangbuk Samsung Health Study. *Gut* 68(9): 1667–75.
- [17] Oni, E., Budoff, M.J., Zeb, I., Li, D., Veledar, E., Polak, J.F., et al., 2019. Nonalcoholic Fatty Liver Disease Is Associated With Arterial Distensibility and Carotid Intima-Media Thickness: (from the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis). *The American Journal of Cardiology* 124(4): 534–8.
- [18] Kapuria, D., Takyar, V.K., Etzion, O., Surana, P., O’Keefe, J.H., Koh, C., 2018. Association of Hepatic Steatosis With Subclinical Atherosclerosis: Systematic Review and Meta-Analysis. *Hepatology Communications* 2(8): 873–83.
- [19] Sinn, D.H., Kang, D., Chang, Y., Ryu, S., Gu, S., Kim, H., et al., 2017. Non-alcoholic fatty liver disease and progression of coronary artery calcium score: a retrospective cohort study. *Gut* 66(2): 323–9.
- [20] Zheng, J., Zhou, Y., Zhang, K., Qi, Y., An, S., Wang, S., et al., 2018. Association between nonalcoholic fatty liver disease and subclinical atherosclerosis: a cross-sectional study on population over 40 years old. *BMC Cardiovascular Disorders* 18(1): 147.
- [21] Xin, Z., Zhu, Y., Wang, S., Liu, S., Xu, M., Wang, T., et al., 2020. Associations of subclinical atherosclerosis with nonalcoholic fatty liver disease and fibrosis assessed by non-invasive score. *Liver International: Official Journal of the International Association for the Study of the Liver* 40(4): 806–14.
- [22] Harada, P.H., Bensenõr, I.J.M., Drager, L.F., Goulart, A.C., Mill, J.G., Lotufo, P.A., 2019. Non-alcoholic fatty liver disease presence and severity are associated with aortic stiffness beyond abdominal obesity: The ELSA-Brasil. *Atherosclerosis* 284: 59–65.
- [23] Lee, S.B., Park, G.-M., Lee, J.-Y., Lee, B.U., Park, J.H., Kim, B.G., et al., 2018. Association between non-alcoholic fatty liver disease and subclinical coronary atherosclerosis: An observational cohort study. *Journal of Hepatology* 68(5): 1018–24.
- [24] Koo, B.K., Allison, M.A., Criqui, M.H., Denenberg, J.O., Wright, C.M., 2020. The association between liver fat and systemic calcified atherosclerosis. *Journal of Vascular Surgery* 71(1): 204-211.e4.
- [25] Park, H.E., Lee, H., Choi, S.-Y., Kwak, M.-S., Yang, J.I., Yim, J.Y., et al., 2019. Clinical significance of hepatic steatosis according to coronary plaque morphology: assessment using controlled attenuation parameter. *Journal of Gastroenterology* 54(3): 271–80.
- [26] Moon, S.H., Noh, T.S., Cho, Y.S., Hong, S.P., Hyun, S.H., Choi, J.Y., et al., 2015. Association between nonalcoholic fatty liver disease and carotid artery inflammation evaluated by 18F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography. *Angiology* 66(5): 472–80.
- [27] Lee, H.J., Lee, C.H., Kim, S., Hwang, S.Y., Hong, H.C., Choi, H.Y., et al., 2017. Association between vascular inflammation and non-alcoholic fatty liver disease: Analysis by 18F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography. *Metabolism: Clinical and Experimental* 67: 72–9.
- [28] Luukkonen, P.K., Nick, A., Hölttä-Vuori, M., Thiele, C., Isokuortti, E., Lallukka-Brück, S., et al., 2019. Human PNPLA3-I148M variant increases hepatic retention of polyunsaturated fatty acids. *JCI Insight* 4(16): e127902.
- [29] Brouwers, M.C.G.J., Simons, N., Stehouwer, C.D.A., Koek, G.H., Schaper, N.C., Isaacs, A., 2019. Relationship Between Nonalcoholic Fatty Liver Disease Susceptibility Genes and Coronary Artery Disease. *Hepatology Communications* 3(4): 587–96.
- [30] Speliotes, E.K., Yerges-Armstrong, L.M., Wu, J., Hernaez, R., Kim, L.J., Palmer, C.D., et al., 2011. Genome-wide association analysis identifies variants associated with nonalcoholic fatty liver disease that have distinct effects on metabolic traits. *PLoS Genetics* 7(3): e1001324.

- [31] Anstee, Q.M., Darlay, R., Cockell, S., Meroni, M., Govaere, O., Tiniakos, D., et al., 2020. Genome-wide association study of non-alcoholic fatty liver and steatohepatitis in a histologically-characterised cohort. *Journal of Hepatology* 73(3): 505–15.
- [32] Donnelly, K.L., Smith, C.I., Schwarzenberg, S.J., Jessurun, J., Boldt, M.D., Parks, E.J., 2005. Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *The Journal of Clinical Investigation* 115(5): 1343–51.
- [33] Lambert, J.E., Ramos-Roman, M.A., Browning, J.D., Parks, E.J., 2014. Increased de novo lipogenesis is a distinct characteristic of individuals with nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 146(3): 726–35.
- [34] Liu, D.J., Peloso, G.M., Yu, H., Butterworth, A.S., Wang, X., Mahajan, A., et al., 2017. Exome-wide association study of plasma lipids in >300,000 individuals. *Nature Genetics* 49(12): 1758–66.
- [35] Rüschenbaum, S., Schwarzkopf, K., Friedrich-Rust, M., Seeger, F., Schoelzel, F., Martinez, Y., et al., 2018. Patatin-like phospholipase domain containing 3 variants differentially impact metabolic traits in individuals at high risk for cardiovascular events. *Hepatology Communications* 2(7): 798–806.
- [36] Zhou, Y., Llauradó, G., Orešič, M., Hyötyläinen, T., Orho-Melander, M., Yki-Järvinen, H., 2015. Circulating triacylglycerol signatures and insulin sensitivity in NAFLD associated with the E167K variant in TM6SF2. *Journal of Hepatology* 62(3): 657–63.
- [37] Sliz, E., Sebert, S., Würtz, P., Kangas, A.J., Soininen, P., Lehtimäki, T., et al., 2018. NAFLD risk alleles in PNPLA3, TM6SF2, GCKR and LYPLAL1 show divergent metabolic effects. *Human Molecular Genetics* 27(12): 2214–23.
- [38] Pirola, C.J., Sookoian, S., 2015. The dual and opposite role of the TM6SF2-rs58542926 variant in protecting against cardiovascular disease and conferring risk for nonalcoholic fatty liver: A meta-analysis. *Hepatology (Baltimore, Md.)* 62(6): 1742–56.
- [39] Simons, N., Isaacs, A., Koek, G.H., Kuč, S., Schaper, N.C., Brouwers, M.C.G.J., 2017. PNPLA3, TM6SF2, and MBOAT7 Genotypes and Coronary Artery Disease. *Gastroenterology* 152(4): 912–3.
- [40] Holmen, O.L., Zhang, H., Fan, Y., Hovelson, D.H., Schmidt, E.M., Zhou, W., et al., 2014. Systematic evaluation of coding variation identifies a candidate causal variant in TM6SF2 influencing total cholesterol and myocardial infarction risk. *Nature Genetics* 46(4): 345–51.
- [41] Dongiovanni, P., Petta, S., Maglio, C., Fracanzani, A.L., Pipitone, R., Mozzi, E., et al., 2015. Transmembrane 6 superfamily member 2 gene variant disentangles nonalcoholic steatohepatitis from cardiovascular disease. *Hepatology (Baltimore, Md.)* 61(2): 506–14.
- [42] Lauridsen, B.K., Stender, S., Kristensen, T.S., Kofoed, K.F., Køber, L., Nordestgaard, B.G., et al., 2018. Liver fat content, non-alcoholic fatty liver disease, and ischaemic heart disease: Mendelian randomization and meta-analysis of 279 013 individuals. *European Heart Journal* 39(5): 385–93.
- [43] Käräjämäki, A.J., Hukkanen, J., Kauma, H., Kesäniemi, Y.A., Ukkola, O., 2020. Metabolic syndrome but not genetic polymorphisms known to induce NAFLD predicts increased total mortality in subjects with NAFLD (OPERA study). *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation* 80(2): 106–13.
- [44] Unalp-Arida, A., Ruhl, C.E., 2020. Patatin-Like Phospholipase Domain-Containing Protein 3 I148M and Liver Fat and Fibrosis Scores Predict Liver Disease Mortality in the U.S. Population. *Hepatology (Baltimore, Md.)* 71(3): 820–34.
- [45] Grimaudo, S., Pipitone, R.M., Pennisi, G., Celsa, C., Cammà, C., Di Marco, V., et al., 2020. Association Between PNPLA3 rs738409 C>G Variant and Liver-Related Outcomes in Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Clinical Gastroenterology and Hepatology: The Official Clinical Practice Journal of the American Gastroenterological Association* 18(4): 935-944.e3.

- [46] Ormazabal, V., Nair, S., Elfeky, O., Aguayo, C., Salomon, C., Zuñiga, F.A., 2018. Association between insulin resistance and the development of cardiovascular disease. *Cardiovascular Diabetology* 17(1): 122.
- [47] Haas, J.T., Vonghia, L., Mogilenko, D.A., Verrijken, A., Molendi-Coste, O., Fleury, S., et al., 2019. Transcriptional Network Analysis Implicates Altered Hepatic Immune Function in NASH development and resolution. *Nature Metabolism* 1(6): 604–14.
- [48] Gehrke, N., Schattenberg, J.M., 2020. Metabolic Inflammation—A Role for Hepatic Inflammatory Pathways as Drivers of Comorbidities in Nonalcoholic Fatty Liver Disease? *Gastroenterology* 158(7): 1929-1947.e6.
- [49] Chen, Z., Qin, H., Qiu, S., Chen, G., Chen, Y., 2019. Correlation of triglyceride to high-density lipoprotein cholesterol ratio with nonalcoholic fatty liver disease among the non-obese Chinese population with normal blood lipid levels: a retrospective cohort research. *Lipids in Health and Disease* 18(1): 162.
- [50] Yang, M.H., Sung, J., Gwak, G.-Y., 2016. The associations between apolipoprotein B, A1, and the B/A1 ratio and nonalcoholic fatty liver disease in both normal-weight and overweight Korean population. *Journal of Clinical Lipidology* 10(2): 289–98.
- [51] Bril, F., Sninsky, J.J., Baca, A.M., Superko, H.R., Portillo Sanchez, P., Biernacki, D., et al., 2016. Hepatic Steatosis and Insulin Resistance, But Not Steatohepatitis, Promote Atherogenic Dyslipidemia in NAFLD. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 101(2): 644–52.
- [52] Peng, K., Mo, Z., Tian, G., 2017. Serum Lipid Abnormalities and Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Adult Males. *The American Journal of the Medical Sciences* 353(3): 236–41.
- [53] Ben-Aicha, S., Badimon, L., Vilahur, G., 2020. Advances in HDL: Much More than Lipid Transporters. *International Journal of Molecular Sciences* 21(3).
- [54] Hodson, L., Gunn, P.J., 2019. The regulation of hepatic fatty acid synthesis and partitioning: the effect of nutritional state. *Nature Reviews. Endocrinology* 15(12): 689–700.
- [55] Haas, J.T., Miao, J., Chanda, D., Wang, Y., Zhao, E., Haas, M.E., et al., 2012. Hepatic insulin signaling is required for obesity-dependent expression of SREBP-1c mRNA but not for feeding-dependent expression. *Cell Metabolism* 15(6): 873–84.
- [56] Smith, G.I., Shankaran, M., Yoshino, M., Schweitzer, G.G., Chondronikola, M., Beals, J.W., et al., 2020. Insulin resistance drives hepatic de novo lipogenesis in nonalcoholic fatty liver disease. *The Journal of Clinical Investigation* 130(3): 1453–60.
- [57] McGarry, J.D., Leatherman, G.F., Foster, D.W., 1978. Carnitine palmitoyltransferase I. The site of inhibition of hepatic fatty acid oxidation by malonyl-CoA. *The Journal of Biological Chemistry* 253(12): 4128–36.
- [58] Roumans, K.H.M., Lindeboom, L., Veeraiyah, P., Remie, C.M.E., Phielix, E., Havekes, B., et al., 2020. Hepatic saturated fatty acid fraction is associated with de novo lipogenesis and hepatic insulin resistance. *Nature Communications* 11(1): 1891.
- [59] Zhang, D., Tong, X., VanDommelen, K., Gupta, N., Stamper, K., Brady, G.F., et al., 2017. Lipogenic transcription factor ChREBP mediates fructose-induced metabolic adaptations to prevent hepatotoxicity. *The Journal of Clinical Investigation* 127(7): 2855–67.
- [60] Bricambert, J., Alves-Guerra, M.-C., Esteves, P., Prip-Buus, C., Bertrand-Michel, J., Guillou, H., et al., 2018. The histone demethylase Phf2 acts as a molecular checkpoint to prevent NAFLD progression during obesity. *Nature Communications* 9(1): 2092.
- [61] Kim, C.-W., Addy, C., Kusunoki, J., Anderson, N.N., Deja, S., Fu, X., et al., 2017. Acetyl CoA Carboxylase Inhibition Reduces Hepatic Steatosis but Elevates Plasma Triglycerides in Mice and Humans: A Bedside to Bench Investigation. *Cell Metabolism* 26(2): 394-406.e6.

- [62] Adiels, M., Olofsson, S.-O., Taskinen, M.-R., Borén, J., 2008. Overproduction of very low-density lipoproteins is the hallmark of the dyslipidemia in the metabolic syndrome. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 28(7): 1225–36.
- [63] Nordestgaard, B.G., Nicholls, S.J., Langsted, A., Ray, K.K., Tybjaerg-Hansen, A., 2018. Advances in lipid-lowering therapy through gene-silencing technologies. *Nature Reviews. Cardiology* 15(5): 261–72.
- [64] Langsted, A., Madsen, C.M., Nordestgaard, B.G., 2020. Contribution of remnant cholesterol to cardiovascular risk. *Journal of Internal Medicine* 288(1): 116–27.
- [65] Fabbrini, E., Mohammed, B.S., Magkos, F., Korenblat, K.M., Patterson, B.W., Klein, S., 2008. Alterations in adipose tissue and hepatic lipid kinetics in obese men and women with nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 134(2): 424–31.
- [66] Mittendorfer, B., Yoshino, M., Patterson, B.W., Klein, S., 2016. VLDL Triglyceride Kinetics in Lean, Overweight, and Obese Men and Women. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 101(11): 4151–60.
- [67] Richardson, T.G., Sanderson, E., Palmer, T.M., Ala-Korpela, M., Ference, B.A., Davey Smith, G., et al., 2020. Evaluating the relationship between circulating lipoprotein lipids and apolipoproteins with risk of coronary heart disease: A multivariable Mendelian randomisation analysis. *PLoS Medicine* 17(3): e1003062.
- [68] Poulsen, M.K., Nellemann, B., Stødkilde-Jørgensen, H., Pedersen, S.B., Grønbæk, H., Nielsen, S., 2016. Impaired Insulin Suppression of VLDL-Triglyceride Kinetics in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 101(4): 1637–46.
- [69] van der Veen, J.N., Kennelly, J.P., Wan, S., Vance, J.E., Vance, D.E., Jacobs, R.L., 2017. The critical role of phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine metabolism in health and disease. *Biochimica Et Biophysica Acta. Biomembranes* 1859(9 Pt B): 1558–72.
- [70] DeLong, C.J., Shen, Y.J., Thomas, M.J., Cui, Z., 1999. Molecular distinction of phosphatidylcholine synthesis between the CDP-choline pathway and phosphatidylethanolamine methylation pathway. *The Journal of Biological Chemistry* 274(42): 29683–8.
- [71] Li, Z., Agellon, L.B., Allen, T.M., Umeda, M., Jewell, L., Mason, A., et al., 2006. The ratio of phosphatidylcholine to phosphatidylethanolamine influences membrane integrity and steatohepatitis. *Cell Metabolism* 3(5): 321–31.
- [72] Nakatsuka, A., Matsuyama, M., Yamaguchi, S., Katayama, A., Eguchi, J., Murakami, K., et al., 2016. Insufficiency of phosphatidylethanolamine N-methyltransferase is risk for lean non-alcoholic steatohepatitis. *Scientific Reports* 6(21721).
- [73] Wan, S., Kuipers, F., Havinga, R., Ando, H., Vance, D.E., Jacobs, R.L., et al., 2019. Impaired Hepatic Phosphatidylcholine Synthesis Leads to Cholestasis in Mice Challenged With a High-Fat Diet. *Hepatology Communications* 3(2): 262–76.
- [74] Simon, J., Nuñez-García, M., Fernández-Tussy, P., Barbier-Torres, L., Fernández-Ramos, D., Gómez-Santos, B., et al., 2020. Targeting Hepatic Glutaminase 1 Ameliorates Non-alcoholic Steatohepatitis by Restoring Very-Low-Density Lipoprotein Triglyceride Assembly. *Cell Metabolism* 31(3): 605-622.e10.
- [75] Chen, Y.Q., Pottanat, T.G., Siegel, R.W., Ehsani, M., Qian, Y.-W., Zhen, E.Y., et al., 2020. Angiotensin-like protein 8 differentially regulates ANGPTL3 and ANGPTL4 during postprandial partitioning of fatty acids. *Journal of Lipid Research* 61(8): 1203–20.
- [76] Jørgensen, A.B., Frikke-Schmidt, R., West, A.S., Grande, P., Nordestgaard, B.G., Tybjaerg-Hansen, A., 2013. Genetically elevated non-fasting triglycerides and calculated remnant cholesterol as causal risk factors for myocardial infarction. *European Heart Journal* 34(24): 1826–33.

- [77] Jørgensen, A.B., Frikke-Schmidt, R., Nordestgaard, B.G., Tybjaerg-Hansen, A., 2014. Loss-of-function mutations in APOC3 and risk of ischemic vascular disease. *The New England Journal of Medicine* 371(1): 32–41.
- [78] TG and HDL Working Group of the Exome Sequencing Project, National Heart, Lung, and Blood Institute, Crosby, J., Peloso, G.M., Auer, P.L., Crosslin, D.R., Stitzel, N.O., et al., 2014. Loss-of-function mutations in APOC3, triglycerides, and coronary disease. *The New England Journal of Medicine* 371(1): 22–31.
- [79] Dewey, F.E., Gusarova, V., O'Dushlaine, C., Gottesman, O., Trejos, J., Hunt, C., et al., 2016. Inactivating Variants in ANGPTL4 and Risk of Coronary Artery Disease. *The New England Journal of Medicine* 374(12): 1123–33.
- [80] Niki, H., Kishimoto, Y., Saita, E., Ohmori, R., Kondo, K., Momiyama, Y., 2019. Plasma Betatrophin Levels and Carotid Atherosclerosis. *Disease Markers* 2019(4214650).
- [81] Stitzel, N.O., Khera, A.V., Wang, X., Bierhals, A.J., Vourakis, A.C., Sperry, A.E., et al., 2017. ANGPTL3 Deficiency and Protection Against Coronary Artery Disease. *Journal of the American College of Cardiology* 69(16): 2054–63.
- [82] Georgiadi, A., Wang, Y., Stienstra, R., Tjeerdema, N., Janssen, A., Stalenhoef, A., et al., 2013. Overexpression of angiopoietin-like protein 4 protects against atherosclerosis development. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 33(7): 1529–37.
- [83] Zhang, R.-N., Zheng, R.-D., Mi, Y.-Q., Zhou, D., Shen, F., Chen, G.-Y., et al., 2016. APOC3 rs2070666 Is Associated with the Hepatic Steatosis Independently of PNPLA3 rs738409 in Chinese Han Patients with Nonalcoholic Fatty Liver Diseases. *Digestive Diseases and Sciences* 61(8): 2284–93.
- [84] Petersen, K.F., Dufour, S., Hariri, A., Nelson-Williams, C., Foo, J.N., Zhang, X.-M., et al., 2010. Apolipoprotein C3 gene variants in nonalcoholic fatty liver disease. *The New England Journal of Medicine* 362(12): 1082–9.
- [85] Verrijken, A., Beckers, S., Francque, S., Hilden, H., Caron, S., Zegers, D., et al., 2013. A gene variant of PNPLA3, but not of APOC3, is associated with histological parameters of NAFLD in an obese population. *Obesity (Silver Spring, Md.)* 21(10): 2138–45.
- [86] Hyysalo, J., Stojkovic, I., Kotronen, A., Hakkarainen, A., Sevastianova, K., Makkonen, J., et al., 2012. Genetic variation in PNPLA3 but not APOC3 influences liver fat in non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 27(5): 951–6.
- [87] Niu, T.-H., Jiang, M., Xin, Y.-N., Jiang, X.-J., Lin, Z.-H., Xuan, S.-Y., 2014. Lack of association between apolipoprotein C3 gene polymorphisms and risk of nonalcoholic fatty liver disease in a Chinese Han population. *World Journal of Gastroenterology* 20(13): 3655–62.
- [88] Cheng, X., Yamauchi, J., Lee, S., Zhang, T., Gong, Z., Muzumdar, R., et al., 2017. APOC3 Protein Is Not a Predisposing Factor for Fat-induced Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Mice. *The Journal of Biological Chemistry* 292(9): 3692–705.
- [89] Caron, S., Verrijken, A., Mertens, I., Samanez, C.H., Mautino, G., Haas, J.T., et al., 2011. Transcriptional activation of apolipoprotein CIII expression by glucose may contribute to diabetic dyslipidemia. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 31(3): 513–9.
- [90] Francque, S., Verrijken, A., Caron, S., Prawitt, J., Paumelle, R., Derudas, B., et al., 2015. PPAR α gene expression correlates with severity and histological treatment response in patients with non-alcoholic steatohepatitis. *Journal of Hepatology* 63(1): 164–73.
- [91] Borén, J., Watts, G.F., Adiels, M., Söderlund, S., Chan, D.C., Hakkarainen, A., et al., 2015. Kinetic and Related Determinants of Plasma Triglyceride Concentration in Abdominal Obesity: Multicenter Tracer Kinetic Study. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 35(10): 2218–24.

- [92] Yilmaz, Y., Ulukaya, E., Atug, O., Dolar, E., 2009. Serum concentrations of human angiopoietin-like protein 3 in patients with nonalcoholic fatty liver disease: association with insulin resistance. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology* 21(11): 1247–51.
- [93] Barchetta, I., Cimini, F.A., Chiappetta, C., Bertocchini, L., Ceccarelli, V., Capoccia, D., et al., 2020. Relationship between hepatic and systemic angiopoietin-like 3, hepatic Vitamin D receptor expression and NAFLD in obesity. *Liver International: Official Journal of the International Association for the Study of the Liver* 40(9): 2139–47.
- [94] Lee, Y.-H., Lee, S.-G., Lee, C.J., Kim, S.H., Song, Y.-M., Yoon, M.R., et al., 2016. Association between betatrophin/ANGPTL8 and non-alcoholic fatty liver disease: animal and human studies. *Scientific Reports* 6: 24013.
- [95] Hong, B.S., Liu, J., Zheng, J., Ke, W., Huang, Z., Wan, X., et al., 2018. Angiopoietin-like protein 8/betatrophin correlates with hepatocellular lipid content independent of insulin resistance in non-alcoholic fatty liver disease patients. *Journal of Diabetes Investigation* 9(4): 952–8.
- [96] García-Monzón, C., Petrov, P.D., Rey, E., Marañón, P., Del Pozo-Maroto, E., Guzmán, C., et al., 2018. Angiopoietin-Like Protein 8 Is a Novel Vitamin D Receptor Target Gene Involved in Nonalcoholic Fatty Liver Pathogenesis. *The American Journal of Pathology* 188(12): 2800–10.
- [97] Zhang, Y., Li, S., Donelan, W., Xie, C., Wang, H., Wu, Q., et al., 2016. Angiopoietin-like protein 8 (betatrophin) is a stress-response protein that down-regulates expression of adipocyte triglyceride lipase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1861(2): 130–7.
- [98] He, P.-P., Jiang, T., OuYang, X.-P., Liang, Y.-Q., Zou, J.-Q., Wang, Y., et al., 2018. Lipoprotein lipase: Biosynthesis, regulatory factors, and its role in atherosclerosis and other diseases. *Clinica Chimica Acta* 480: 126–37.
- [99] Pastori, D., Baratta, F., Novo, M., Cocomello, N., Violi, F., Angelico, F., et al., 2018. Remnant Lipoprotein Cholesterol and Cardiovascular and Cerebrovascular Events in Patients with Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Journal of Clinical Medicine* 7(11): 378.
- [100] Nordestgaard, B.G., Wootton, R., Lewis, B., 1995. Selective retention of VLDL, IDL, and LDL in the arterial intima of genetically hyperlipidemic rabbits in vivo. Molecular size as a determinant of fractional loss from the intima-inner media. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 15(4): 534–42.
- [101] Ivanova, E.A., Myasoedova, V.A., Melnichenko, A.A., Grechko, A.V., Orekhov, A.N., 2017. Small Dense Low-Density Lipoprotein as Biomarker for Atherosclerotic Diseases. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2017: 1273042.
- [102] McCullough, A., Previs, S.F., Dasarathy, J., Lee, K., Osme, A., Kim, C., et al., 2019. HDL flux is higher in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* 317(5): E852–62.
- [103] Lucero, D., Zago, V., López, G.I., Graffigna, M., López, G.H., Fainboim, H., et al., 2011. Does non-alcoholic fatty liver impair alterations of plasma lipoproteins and associated factors in metabolic syndrome? *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry* 412(7–8): 587–92.
- [104] Tziomalos, K., Athyros, V.G., Paschos, P., Karagiannis, A., 2015. Nonalcoholic fatty liver disease and statins. *Metabolism* 64(10): 1215–23.
- [105] Barb, D., Cusi, K., 2017. Reply to “statins and non-alcoholic steatohepatitis.” *Metabolism* 66: e3–5.
- [106] Bril, F., Portillo Sanchez, P., Lomonaco, R., Orsak, B., Hecht, J., Tio, F., et al., 2017. Liver Safety of Statins in Prediabetes or T2DM and Nonalcoholic Steatohepatitis: Post Hoc Analysis of a Randomized Trial. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 102(8): 2950–61.

- [107] Shahab, O., Biswas, R., Paik, J., Bush, H., Golabi, P., Younossi, Z.M., 2018. Among Patients With NAFLD, Treatment of Dyslipidemia Does Not Reduce Cardiovascular Mortality. *Hepatology Communications* 2(10): 1227–34.
- [108] Margerie, D., Lefebvre, P., Raverdy, V., Schwahn, U., Ruetten, H., Larsen, P., et al., 2019. Hepatic transcriptomic signatures of statin treatment are associated with impaired glucose homeostasis in severely obese patients. *BMC Medical Genomics* 12(1): 80.
- [109] Ruscica, M., Ferri, N., Macchi, C., Meroni, M., Lanti, C., Ricci, C., et al., 2016. Liver fat accumulation is associated with circulating PCSK9. *Annals of Medicine* 48(5): 384–91.
- [110] Lebeau, P.F., Byun, J.H., Platko, K., MacDonald, M.E., Poon, S.V., Faiyaz, M., et al., 2019. Diet-induced hepatic steatosis abrogates cell-surface LDLR by inducing de novo PCSK9 expression in mice. *Journal of Biological Chemistry* 294(23): 9037–47.
- [111] Huang, X.-Y., Shi, G.-M., Devbhandari, R.P., Ke, A.-W., Wang, Y., Wang, X.-Y., et al., 2012. Low level of low-density lipoprotein receptor-related protein 1 predicts an unfavorable prognosis of hepatocellular carcinoma after curative resection. *PLoS One* 7(3): e32775.
- [112] Lebeau, P.F., Byun, J.H., Platko, K., Al-Hashimi, A.A., Lhoták, Š., MacDonald, M.E., et al., 2019. Pcsk9 knockout exacerbates diet-induced non-alcoholic steatohepatitis, fibrosis and liver injury in mice. *JHEP Reports: Innovation in Hepatology* 1(6): 418–29.
- [113] Hamlin, A.N., Chinnarasu, S., Ding, Y., Xian, X., Herz, J., Jaeschke, A., et al., 2018. Low-density lipoprotein receptor-related protein-1 dysfunction synergizes with dietary cholesterol to accelerate steatohepatitis progression. *The Journal of Biological Chemistry* 293(25): 9674–84.
- [114] Espirito Santo, S.M.S., Pires, N.M.M., Boesten, L.S.M., Gerritsen, G., Bovenschen, N., van Dijk, K.W., et al., 2004. Hepatic low-density lipoprotein receptor-related protein deficiency in mice increases atherosclerosis independent of plasma cholesterol. *Blood* 103(10): 3777–82.
- [115] Laatsch, A., Merkel, M., Talmud, P.J., Grewal, T., Beisiegel, U., Heeren, J., 2009. Insulin stimulates hepatic low density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1) to increase postprandial lipoprotein clearance. *Atherosclerosis* 204(1): 105–11.
- [116] Ioannou, G.N., 2016. The Role of Cholesterol in the Pathogenesis of NASH. *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM* 27(2): 84–95.
- [117] Wang, X., Cai, B., Yang, X., Sonubi, O.O., Zheng, Z., Ramakrishnan, R., et al., 2020. Cholesterol Stabilizes TAZ in Hepatocytes to Promote Experimental Non-alcoholic Steatohepatitis. *Cell Metabolism* 31(5): 969-986.e7.
- [118] Gan, L.T., Van Rooyen, D.M., Koina, M.E., McCuskey, R.S., Teoh, N.C., Farrell, G.C., 2014. Hepatocyte free cholesterol lipotoxicity results from JNK1-mediated mitochondrial injury and is HMGB1 and TLR4-dependent. *Journal of Hepatology* 61(6): 1376–84.
- [119] Saeed, N., Nadeau, B., Shannon, C., Tincopa, M., 2019. Evaluation of Dietary Approaches for the Treatment of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: A Systematic Review. *Nutrients* 11(12): 3064.
- [120] Luukkonen, P.K., Dufour, S., Lyu, K., Zhang, X.-M., Hakkarainen, A., Lehtimäki, T.E., et al., 2020. Effect of a ketogenic diet on hepatic steatosis and hepatic mitochondrial metabolism in nonalcoholic fatty liver disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 117(13): 7347–54.
- [121] Mardinoglu, A., Wu, H., Bjornson, E., Zhang, C., Hakkarainen, A., Räsänen, S.M., et al., 2018. An Integrated Understanding of the Rapid Metabolic Benefits of a Carbohydrate-Restricted Diet on Hepatic Steatosis in Humans. *Cell Metabolism* 27(3): 559-571.e5.
- [122] Abdelbasset, W.K., Tantawy, S.A., Kamel, D.M., Alqahtani, B.A., Soliman, G.S., 2019. A randomized controlled trial on the effectiveness of 8-week high-intensity interval exercise on

intrahepatic triglycerides, visceral lipids, and health-related quality of life in diabetic obese patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Medicine* 98(12): e14918.

[123] Shojaei-Moradie, F., Cuthbertson, D.J., Barrett, M., Jackson, N.C., Herring, R., Thomas, E.L., et al., 2016. Exercise Training Reduces Liver Fat and Increases Rates of VLDL Clearance But Not VLDL Production in NAFLD. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 101(11): 4219–28.

[124] Vilar-Gomez, E., Martinez-Perez, Y., Calzadilla-Bertot, L., Torres-Gonzalez, A., Gra-Oramas, B., Gonzalez-Fabian, L., et al., 2015. Weight Loss Through Lifestyle Modification Significantly Reduces Features of Nonalcoholic Steatohepatitis. *Gastroenterology* 149(2): 367-378.e5; quiz e14-15.

[125] Promrat, K., Kleiner, D.E., Niemeier, H.M., Jackvony, E., Kearns, M., Wands, J.R., et al., 2010. Randomized controlled trial testing the effects of weight loss on nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 51(1): 121–9.

[126] Lassailly, G., Caiazzo, R., Buob, D., Pigeire, M., Verkindt, H., Labreuche, J., et al., 2015. Bariatric Surgery Reduces Features of Nonalcoholic Steatohepatitis in Morbidly Obese Patients. *Gastroenterology* 149(2): 379–88; quiz e15-16.

[127] Caiazzo, R., Lassailly, G., Leteurtre, E., Baud, G., Verkindt, H., Raverdy, V., et al., 2014. Roux-en-Y gastric bypass versus adjustable gastric banding to reduce nonalcoholic fatty liver disease: a 5-year controlled longitudinal study. *Annals of Surgery* 260(5): 893–9.

[128] Lassailly, G., Caiazzo, R., Ntandja-Wandji, L.-C., Gnemmi, V., Baud, G., Verkindt, H., et al., 2020. Bariatric Surgery Provides Long-term Resolution of Nonalcoholic Steatohepatitis and Regression of Fibrosis. *Gastroenterology* [Epub ahead of print].

[129] Manco, M., Mosca, A., De Peppo, F., Caccamo, R., Cutrera, R., Giordano, U., et al., 2017. The Benefit of Sleeve Gastrectomy in Obese Adolescents on Nonalcoholic Steatohepatitis and Hepatic Fibrosis. *The Journal of Pediatrics* 180: 31-37.e2.

[130] Praveen Raj, P., Gomes, R.M., Kumar, S., Senthilnathan, P., Karthikeyan, P., Shankar, A., et al., 2015. The effect of surgically induced weight loss on nonalcoholic fatty liver disease in morbidly obese Indians: “NASHOST” prospective observational trial. *Surgery for Obesity and Related Diseases: Official Journal of the American Society for Bariatric Surgery* 11(6): 1315–22.

[131] Schneck, A.-S., Anty, R., Patouraux, S., Bonnafous, S., Rousseau, D., Lebeaupin, C., et al., 2016. Roux-En Y Gastric Bypass Results in Long-Term Remission of Hepatocyte Apoptosis and Hepatic Histological Features of Non-alcoholic Steatohepatitis. *Frontiers in Physiology* 7(344).

[132] Tailleux, A., Rouskas, K., Pattou, F., Staels, B., 2015. Bariatric surgery, lipoprotein metabolism and cardiovascular risk. *Current Opinion in Lipidology* 26(4): 317–24.

[133] Adams, T.D., Davidson, L.E., Litwin, S.E., Kim, J., Kolotkin, R.L., Nanjee, M.N., et al., 2017. Weight and Metabolic Outcomes 12 Years after Gastric Bypass. *The New England Journal of Medicine* 377(12): 1143–55.

[134] Aminian, A., Zajichek, A., Arterburn, D.E., Wolski, K.E., Brethauer, S.A., Schauer, P.R., et al., 2019. Association of Metabolic Surgery With Major Adverse Cardiovascular Outcomes in Patients With Type 2 Diabetes and Obesity. *JAMA* 322(13): 1271–82.

[135] Thereaux, J., Lesuffleur, T., Czernichow, S., Basdevant, A., Msika, S., Nocca, D., et al., 2019. Long-term adverse events after sleeve gastrectomy or gastric bypass: a 7-year nationwide, observational, population-based, cohort study. *The Lancet. Diabetes & Endocrinology* 7(10): 786–95.

[136] Chávez-Talavera, O., Tailleux, A., Lefebvre, P., Staels, B., 2017. Bile Acid Control of Metabolism and Inflammation in Obesity, Type 2 Diabetes, Dyslipidemia, and Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology* 152(7): 1679-1694.e3.

[137] Neuschwander-Tetri, B.A., Loomba, R., Sanyal, A.J., Lavine, J.E., Van Natta, M.L., Abdelmalek, M.F., et al., 2015. Farnesoid X nuclear receptor ligand obeticholic acid for non-cirrhotic,

non-alcoholic steatohepatitis (FLINT): a multicentre, randomised, placebo-controlled trial. *Lancet* (London, England) 385(9972): 956–65.

[138] Younossi, Z.M., Ratziu, V., Loomba, R., Rinella, M., Anstee, Q.M., Goodman, Z., et al., 2019. Obeticholic acid for the treatment of non-alcoholic steatohepatitis: interim analysis from a multicentre, randomised, placebo-controlled phase 3 trial. *Lancet* (London, England) 394(10215): 2184–96.

[139] Labenz, C., Prochaska, J.H., Huber, Y., Nagel, M., Straub, B.K., Wild, P., et al., 2019. Cardiovascular Risk Categories in Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease and the Role of Low-Density Lipoprotein Cholesterol. *Hepatology Communications* 3(11): 1472–81.

[140] Siddiqui, M.S., Van Natta, M.L., Connelly, M.A., Vuppalanchi, R., Neuschwander-Tetri, B.A., Tonascia, J., et al., 2020. Impact of obeticholic acid on the lipoprotein profile in patients with non-alcoholic steatohepatitis. *Journal of Hepatology* 72(1): 25–33.

[141] Pockros, P.J., Fuchs, M., Freilich, B., Schiff, E., Kohli, A., Lawitz, E.J., et al., 2019. CONTROL: A randomized phase 2 study of obeticholic acid and atorvastatin on lipoproteins in nonalcoholic steatohepatitis patients. *Liver International: Official Journal of the International Association for the Study of the Liver* 39(11): 2082–93.

[142] Patel, K., Harrison, S.A., Elkashab, M., Trotter, J.F., Herring, R., Rojter, S., et al., 2020. Cilofexor, a Nonsteroidal FXR Agonist, in Non-Cirrhotic Patients with Nonalcoholic Steatohepatitis: A Phase 2 Randomized Controlled Trial. *Hepatology* (Baltimore, Md.) 72(1): 58–71.

[143] Somm, E., Jornayvaz, F.R., 2018. Fibroblast Growth Factor 15/19: From Basic Functions to Therapeutic Perspectives. *Endocrine Reviews* 39(6): 960–89.

[144] Eren, F., Kurt, R., Ermis, F., Atug, O., Imeryuz, N., Yilmaz, Y., 2012. Preliminary evidence of a reduced serum level of fibroblast growth factor 19 in patients with biopsy-proven nonalcoholic fatty liver disease. *Clinical Biochemistry* 45(9): 655–8.

[145] Harrison, S.A., Rinella, M.E., Abdelmalek, M.F., Trotter, J.F., Paredes, A.H., Arnold, H.L., et al., 2018. NGM282 for treatment of non-alcoholic steatohepatitis: a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2 trial. *Lancet* (London, England) 391(10126): 1174–85.

[146] Harrison, S.A., Rossi, S.J., Paredes, A.H., Trotter, J.F., Bashir, M.R., Guy, C.D., et al., 2019. NGM282 Improves Liver Fibrosis and Histology in 12 Weeks in Patients With Nonalcoholic Steatohepatitis. *Hepatology* (Baltimore, Md.) 71(4): 1198–212.

[147] Rinella, M.E., Trotter, J.F., Abdelmalek, M.F., Paredes, A.H., Connelly, M.A., Jaros, M.J., et al., 2019. Rosuvastatin improves the FGF19 analogue NGM282-associated lipid changes in patients with non-alcoholic steatohepatitis. *Journal of Hepatology* 70(4): 735–44.

[148] Zhou, M., Learned, R.M., Rossi, S.J., Tian, H., DePaoli, A.M., Ling, L., 2019. Therapeutic FGF19 promotes HDL biogenesis and transhepatic cholesterol efflux to prevent atherosclerosis. *Journal of Lipid Research* 60(3): 550–65.

[149] Hao, Y., Zhou, J., Zhou, M., Ma, X., Lu, Z., Gao, M., et al., 2013. Serum levels of fibroblast growth factor 19 are inversely associated with coronary artery disease in chinese individuals. *PLoS One* 8(8): e72345.

[150] Newsome, P.N., Palmer, M., Freilich, B., Sheikh, M.Y., Sheikh, A., Sarles, H., et al., 2020. Volixibat in adults with non-alcoholic steatohepatitis: 24-week interim analysis from a randomized, phase II study. *Journal of Hepatology* 73(2): 231–40.

[151] Le, T.-A., Chen, J., Changchien, C., Peterson, M.R., Kono, Y., Patton, H., et al., 2012. Effect of colesvelam on liver fat quantified by magnetic resonance in nonalcoholic steatohepatitis: a randomized controlled trial. *Hepatology* (Baltimore, Md.) 56(3): 922–32.

- [152] Dubois, V., Eeckhoute, J., Lefebvre, P., Staels, B., 2017. Distinct but complementary contributions of PPAR isotypes to energy homeostasis. *The Journal of Clinical Investigation* 127(4): 1202–14.
- [153] Staels, B., Maes, M., Zambon, A., 2008. Fibrates and future PPAR α agonists in the treatment of cardiovascular disease. *Nature Clinical Practice. Cardiovascular Medicine* 5(9): 542–53.
- [154] Liss, K.H.H., Finck, B.N., 2017. PPARs and nonalcoholic fatty liver disease. *Biochimie* 136: 65–74.
- [155] Musso, G., Cassader, M., Paschetta, E., Gambino, R., 2017. Thiazolidinediones and Advanced Liver Fibrosis in Nonalcoholic Steatohepatitis: A Meta-analysis. *JAMA Internal Medicine* 177(5): 633–40.
- [156] Ratziu, V., Giral, P., Jacqueminet, S., Charlotte, F., Hartemann-Heurtier, A., Serfaty, L., et al., 2008. Rosiglitazone for nonalcoholic steatohepatitis: one-year results of the randomized placebo-controlled Fatty Liver Improvement with Rosiglitazone Therapy (FLIRT) Trial. *Gastroenterology* 135(1): 100–10.
- [157] Ratziu, V., Charlotte, F., Bernhardt, C., Giral, P., Halbron, M., Lenaour, G., et al., 2010. Long-term efficacy of rosiglitazone in nonalcoholic steatohepatitis: results of the fatty liver improvement by rosiglitazone therapy (FLIRT 2) extension trial. *Hepatology (Baltimore, Md.)* 51(2): 445–53.
- [158] Musso, G., Cassader, M., Paschetta, E., Gambino, R., 2017. Pioglitazone for advanced fibrosis in nonalcoholic steatohepatitis: New evidence, new challenges. *Hepatology* 65(3): 1058–61.
- [159] Cusi, K., Orsak, B., Bril, F., Lomonaco, R., Hecht, J., Ortiz-Lopez, C., et al., 2016. Long-Term Pioglitazone Treatment for Patients With Nonalcoholic Steatohepatitis and Prediabetes or Type 2 Diabetes Mellitus: A Randomized Trial. *Annals of Internal Medicine* 165(5): 305–15.
- [160] Bril, F., Kalavalapalli, S., Clark, V.C., Lomonaco, R., Soldevila-Pico, C., Liu, I.-C., et al., 2018. Response to Pioglitazone in Patients With Nonalcoholic Steatohepatitis With vs Without Type 2 Diabetes. *Clinical Gastroenterology and Hepatology: The Official Clinical Practice Journal of the American Gastroenterological Association* 16(4): 558-566.e2.
- [161] Goldberg, R.B., Kendall, D.M., Deeg, M.A., Buse, J.B., Zagar, A.J., Pinaire, J.A., et al., 2005. A comparison of lipid and glycemic effects of pioglitazone and rosiglitazone in patients with type 2 diabetes and dyslipidemia. *Diabetes Care* 28(7): 1547–54.
- [162] Filipova, E., Uzunova, K., Kalinov, K., Vekov, T., 2017. Effects of pioglitazone therapy on blood parameters, weight and BMI: a meta-analysis. *Diabetology & Metabolic Syndrome* 9: 90.
- [163] Dormandy, J.A., Charbonnel, B., Eckland, D.J.A., Erdmann, E., Massi-Benedetti, M., Moules, I.K., et al., 2005. Secondary prevention of macrovascular events in patients with type 2 diabetes in the PROactive Study (PROspective pioglitAzone Clinical Trial In macroVascular Events): a randomised controlled trial. *Lancet (London, England)* 366(9493): 1279–89.
- [164] Wallach, J.D., Wang, K., Zhang, A.D., Cheng, D., Grossetta Nardini, H.K., Lin, H., et al., 2020. Updating insights into rosiglitazone and cardiovascular risk through shared data: individual patient and summary level meta-analyses. *BMJ (Clinical Research Ed.)* 368: l7078.
- [165] de Jong, M., van der Worp, H.B., van der Graaf, Y., Visseren, F.L.J., Westerink, J., 2017. Pioglitazone and the secondary prevention of cardiovascular disease. A meta-analysis of randomized-controlled trials. *Cardiovascular Diabetology* 16(1): 134.
- [166] Kernan, W.N., Viscoli, C.M., Furie, K.L., Young, L.H., Inzucchi, S.E., Gorman, M., et al., 2016. Pioglitazone after Ischemic Stroke or Transient Ischemic Attack. *The New England Journal of Medicine* 374(14): 1321–31.

- [167] Sanyal, A.J., Chalasani, N., Kowdley, K.V., McCullough, A., Diehl, A.M., Bass, N.M., et al., 2010. Pioglitazone, vitamin E, or placebo for nonalcoholic steatohepatitis. *The New England Journal of Medicine* 362(18): 1675–85.
- [168] Corey, K.E., Wilson, L.A., Altinbas, A., Yates, K.P., Kleiner, D.E., Chung, R.T., et al., 2019. Relationship between resolution of non-alcoholic steatohepatitis and changes in lipoprotein sub-fractions: a post-hoc analysis of the PIVENS trial. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 49(9): 1205–13.
- [169] Corey, K.E., Vuppalanchi, R., Wilson, L.A., Cummings, O.W., Chalasani, N., 2015. NASH resolution is associated with improvements in HDL and triglyceride levels but not improvement in LDL or non-HDL-C levels. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 41(3): 301–9.
- [170] Orasanu, G., Ziouzenkova, O., Devchand, P.R., Nehra, V., Hamdy, O., Horton, E.S., et al., 2008. The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist pioglitazone represses inflammation in a peroxisome proliferator-activated receptor-alpha-dependent manner in vitro and in vivo in mice. *Journal of the American College of Cardiology* 52(10): 869–81.
- [171] Sakamoto, J., Kimura, H., Moriyama, S., Odaka, H., Momose, Y., Sugiyama, Y., et al., 2000. Activation of human peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) subtypes by pioglitazone. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 278(3): 704–11.
- [172] Bays, H.E., Schwartz, S., Littlejohn, T., Kerzner, B., Krauss, R.M., Karpf, D.B., et al., 2011. MBX-8025, a novel peroxisome proliferator receptor-delta agonist: lipid and other metabolic effects in dyslipidemic overweight patients treated with and without atorvastatin. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 96(9): 2889–97.
- [173] Ratzliff, V., Harrison, S.A., Francque, S., Bedossa, P., Leher, P., Serfaty, L., 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): 1147-1159.e5.
- [174] Jain, M.R., Giri, S.R., Bhoi, B., Trivedi, C., Rath, A., Rathod, R., et al., 2018. Dual PPAR α / γ agonist saroglitazar improves liver histopathology and biochemistry in experimental NASH models. *Liver International: Official Journal of the International Association for the Study of the Liver* 38(6): 1084–94.
- [175] Boubia, B., Poupardin, O., Barth, M., Binet, J., Peralba, P., Mounier, L., et al., 2018. Design, Synthesis, and Evaluation of a Novel Series of Indole Sulfonamide Peroxisome Proliferator Activated Receptor (PPAR) α / γ / δ Triple Activators: Discovery of Lanifibranor, a New Antifibrotic Clinical Candidate. *Journal of Medicinal Chemistry* 61(6): 2246–65.
- [176] Staiger, H., Keuper, M., Berti, L., Hrabě de Angelis, M., Häring, H.-U., 2017. Fibroblast Growth Factor 21—Metabolic Role in Mice and Men. *Endocrine Reviews* 38(5): 468–88.
- [177] Sanyal, A., Charles, E.D., Neuschwander-Tetri, B.A., Loomba, R., Harrison, S.A., Abdelmalek, M.F., et al., 2019. Pegbelfermin (BMS-986036), a PEGylated fibroblast growth factor 21 analogue, in patients with non-alcoholic steatohepatitis: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2a trial. *Lancet (London, England)* 392(10165): 2705–17.
- [178] Lin, Z., Pan, X., Wu, F., Ye, D., Zhang, Y., Wang, Y., et al., 2015. Fibroblast growth factor 21 prevents atherosclerosis by suppression of hepatic sterol regulatory element-binding protein-2 and induction of adiponectin in mice. *Circulation* 131(21): 1861–71.
- [179] Yan, X., Gou, Z., Li, Y., Wang, Y., Zhu, J., Xu, G., et al., 2018. Fibroblast growth factor 21 inhibits atherosclerosis in apoE^{-/-} mice by ameliorating Fas-mediated apoptosis. *Lipids in Health and Disease* 17(1): 203.
- [180] Ritter, M.J., Amano, I., Hollenberg, A.N., 2020. Thyroid Hormone Signaling and the Liver. *Hepatology (Baltimore, Md.)* 72(2): 742–52.

- [181] Harrison, S.A., Bashir, M.R., Guy, C.D., Zhou, R., Moylan, C.A., Frias, J.P., et al., 2019. Resmetirom (MGL-3196) for the treatment of non-alcoholic steatohepatitis: a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2 trial. *Lancet* (London, England) 394(10213): 2012–24.
- [182] Armstrong, M.J., Gaunt, P., Aithal, G.P., Barton, D., Hull, D., Parker, R., et al., 2016. Liraglutide safety and efficacy in patients with non-alcoholic steatohepatitis (LEAN): a multicentre, double-blind, randomised, placebo-controlled phase 2 study. *Lancet* (London, England) 387(10019): 679–90.
- [183] Marso, S.P., Daniels, G.H., Brown-Frandsen, K., Kristensen, P., Mann, J.F.E., Nauck, M.A., et al., 2016. Liraglutide and Cardiovascular Outcomes in Type 2 Diabetes. *The New England Journal of Medicine* 375(4): 311–22.
- [184] Marso, S.P., Bain, S.C., Consoli, A., Eliaschewitz, F.G., Jódar, E., Leiter, L.A., et al., 2016. Semaglutide and Cardiovascular Outcomes in Patients with Type 2 Diabetes. *The New England Journal of Medicine* 375(19): 1834–44.
- [185] Rakipovski, G., Rolin, B., Nøhr, J., Klewe, I., Frederiksen, K.S., Augustin, R., et al., 2018. The GLP-1 Analogs Liraglutide and Semaglutide Reduce Atherosclerosis in ApoE^{-/-} and LDLr^{-/-} Mice by a Mechanism That Includes Inflammatory Pathways. *JACC. Basic to Translational Science* 3(6): 844–57.
- [186] Nagashima, M., Watanabe, T., Terasaki, M., Tomoyasu, M., Nohtomi, K., Kim-Kaneyama, J., et al., 2011. Native incretins prevent the development of atherosclerotic lesions in apolipoprotein E knockout mice. *Diabetologia* 54(10): 2649–59.
- [187] Parlevliet, E.T., Wang, Y., Geerling, J.J., Schröder-Van der Elst, J.P., Picha, K., O’Neil, K., et al., 2012. GLP-1 receptor activation inhibits VLDL production and reverses hepatic steatosis by decreasing hepatic lipogenesis in high-fat-fed APOE*3-Leiden mice. *PloS One* 7(11): e49152.
- [188] Loomba, R., Kayali, Z., Noureddin, M., Ruane, P., Lawitz, E.J., Bennett, M., et al., 2018. GS-0976 Reduces Hepatic Steatosis and Fibrosis Markers in Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology* 155(5): 1463-1473.e6.

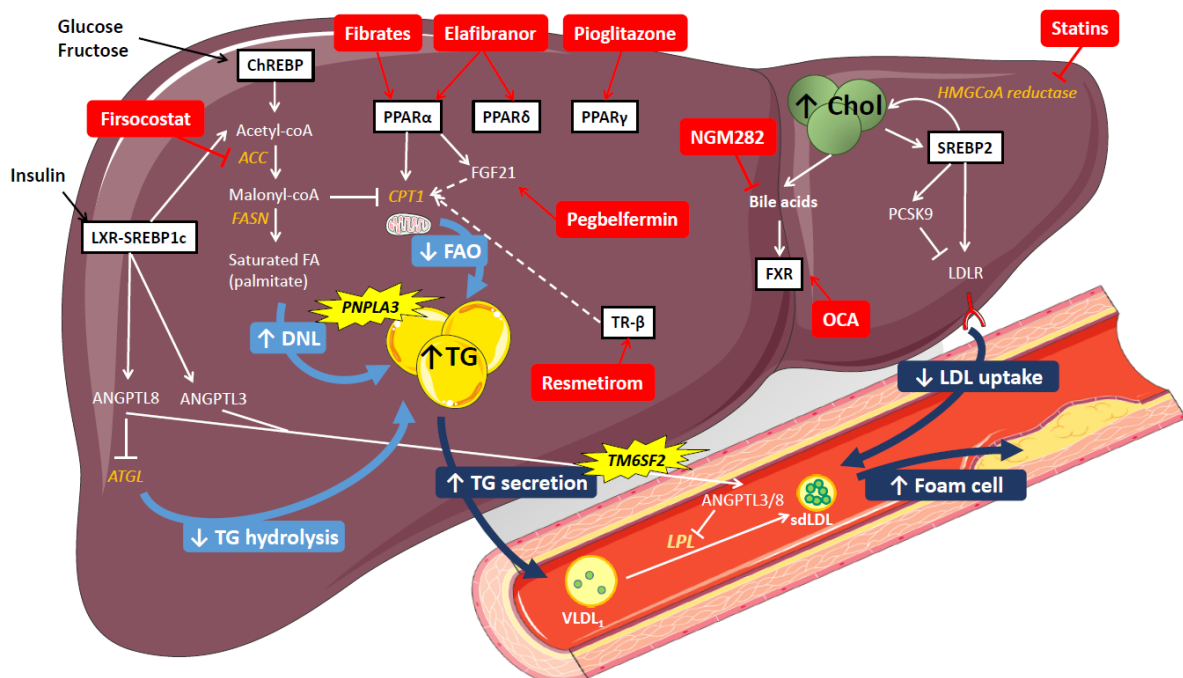


Figure 1: A summary of pathways of hepatic lipid metabolism altered in NAFLD and driving dyslipidemia.

Increased hepatic TG in NAFLD is a result of several processes. Elevated plasma insulin and glucose levels respectively activate the LXR and ChREBP pathways, which increase de novo lipogenesis (DNL). Through the action of ACC, DNL increases the concentration of malonyl-coA, leading to inhibition of CPT1 and consequently reducing fatty acid oxidation (FAO) and mitochondrial function. In parallel, LXR increases the expression of ANGPTL8 and 3, two inhibitors of LPL. Moreover, ANGPTL8 contributes to increase hepatic TG by decreasing intracellular TG hydrolysis through inhibition of ATGL. Increased hepatic TG content leads to increased TG secretion and, as a consequence, increased plasma TG levels.

Increased intracellular cholesterol in the liver inhibits the SREBP2 pathway. SREBP2 increases LDLR and PCSK9 mRNA expression. These changes, combined with additional post-transcriptional regulation of PCSK9 lead to reduced membrane-bound LDLR which leads to decrease LDL uptake by the liver.

The ensemble of these changes contribute to increased large VLDL1 and to the formation of small dense LDL which favors foam cell formation and ultimately atherosclerosis.

A number of potential NASH therapies directly target metabolic pathways of lipid metabolism. For example, firsocostat inhibits ACC, hence reducing DNL and hepatic TG accumulation. Statins inhibit HMGCoA reductase, the rate-limiting enzyme in cholesterol biosynthesis. Other strategies focus on activation of different nuclear receptors, which more broadly control lipid and glucose metabolism. These include nuclear receptors from the PPAR family, FXR and TR- β . Among those treatments, fibrates are PPAR α agonists, pegbelfermin is a FGF21 analog (a PPAR α target gene), thiazolidinediones (e.g. pioglitazone and rosiglitazone) are PPAR γ agonists, elafibranor is a dual PPAR α/δ agonist, lanifibranor is a pan-PPAR agonist, obeticholic acid (OCA) is an FXR agonist, NGM282 is a FGF19 analog (FXR target gene in the intestine) and resmetirom is a TR- β agonist.

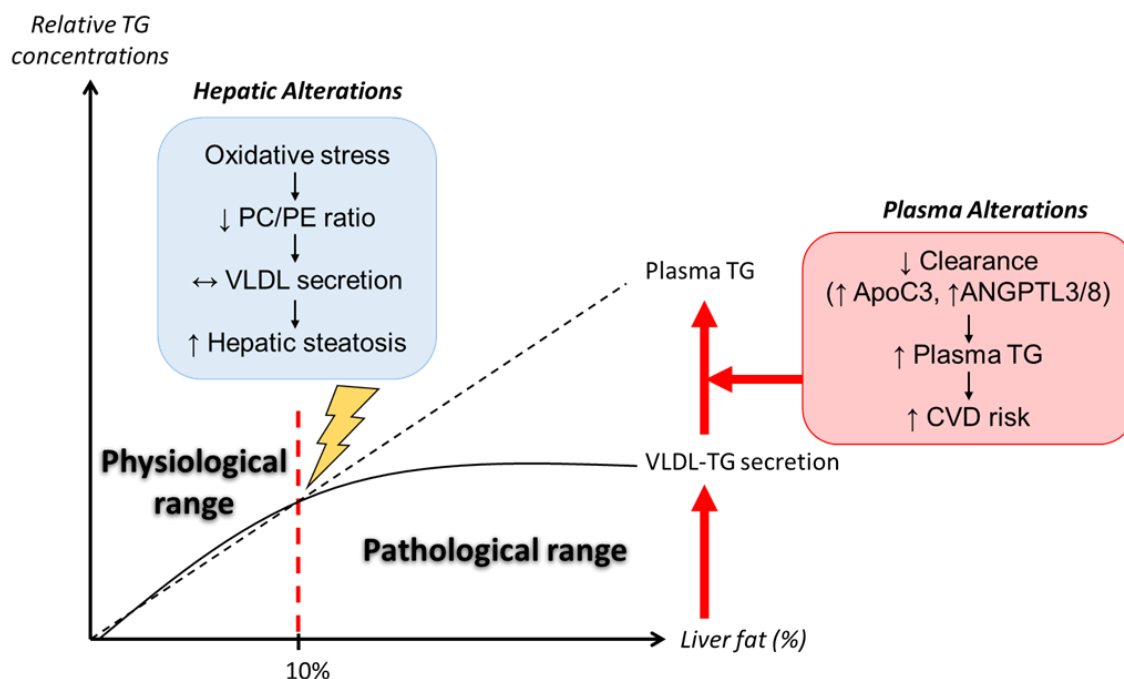


Figure 2: The dynamic balance between hepatic VLDL-TG secretion and plasma clearance determine the association between NAFLD and plasma triglycerides.

When intrahepatic TG reach of the level of ~10% , oxidative stress increases leading to decreased PC availability, preventing further increases in hepatic VLDL-TG secretion, thereby favoring hepatic steatosis. In parallel, circulating inhibitors of lipoprotein lipase such as ApoC3 and ANGPTL3/8 are increased due to the presence of insulin resistance and exacerbate plasma hypertriglyceridemia by reducing intravascular TG hydrolysis. The dynamic balance between these factors explains the positive correlation between plasma hypertriglyceridemia and hepatic steatosis.

Annexe 2 : Article publié dans Nature metabolisme²²¹.

Transcriptional Network Analysis Implicates Altered Hepatic Immune Function in NASH development and resolution

Joel T. Haas^{1,6}, Luisa Vonghia^{*2-3,6}, Denis A. Mogilenko^{1,6}, An Verrijken³⁻⁴, Olivier Molendi-Coste¹, Sébastien Fleury¹, Audrey Deprince¹, Artemii Nikitin¹, Eloïse Woittrain¹, Lucie Ducrocq-Geoffroy¹, Samuel Pic¹, Bruno Derudas¹, Hélène Dehondt¹, Céline Gheeraert¹, Luc Van Gaal³⁻⁴, Ann Driessen⁵, Philippe Lefebvre¹, Bart Staels^{1,7}, Sven Francque^{2-3,7}, David Dombrowicz^{*1,7}

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

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

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

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

⁵Department of Pathology, Antwerp University Hospital, University of Antwerp, Antwerp, Belgium.

⁶These authors equally contributed to the work

⁷These authors equally contributed to the work

***Address for correspondence:** David Dombrowicz. Inserm U1011. Institut Pasteur de Lille. 1, r. Prof. Calmette BP245. 59019 Lille Cedex. France. E-mail: david.dombrowicz@pasteur-lille.fr. Luisa Vonghia. Universitair Ziekenhuis Antwerp. Gastro-enterologie en Hepatologie. Wilrijkstraat 10. 2650 Edegem. Belgium. E-mail: luisa.vonghia@uza.be.

Abstract

Progression of fatty liver to non-alcoholic steatohepatitis (NASH) is a rapidly growing health problem. Presence of inflammatory infiltrates in the liver and hepatocyte damage distinguish NASH from simple steatosis. However, the underlying molecular mechanisms involved in the development of NASH remain to be fully understood. Here we perform transcriptional and immune profiling of NASH patients before and after lifestyle intervention (LSI). Analysis of liver microarray data from a cohort of patients with histologically assessed NAFLD reveals a hepatic gene signature, which is associated with NASH and is sensitive to regression of NASH activity upon LSI independently of body weight loss. Enrichment analysis reveals the presence of immune-associated genes linked to inflammatory responses, antigen presentation and cytotoxic cells in the NASH-linked gene signature. In an independent cohort, NASH is also associated with alterations in blood immune cell populations, including conventional dendritic cells (cDC) type 1 and 2, and cytotoxic CD8 T cells. Lobular inflammation and ballooning are associated with the accumulation of CD8 T cells in the liver. Progression from simple steatosis to NASH in a mouse model of diet-driven NASH results in a comparable immune-related hepatic expression signature and the accumulation of intra-hepatic cDC and CD8 T cells. These results show that NASH, compared to normal liver or simple steatosis, is associated with a distinct hepatic immune-related gene signature, elevated hepatic CD8 T cells, and altered antigen-presenting and cytotoxic cells in blood. These findings expand our understanding of NASH and may identify potential targets for NASH therapy.

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is the most common chronic liver disease. Its increasing prevalence is driven by high-calorie diets and sedentary lifestyles. Central obesity, insulin resistance (IR) and type 2 diabetes (T2D) are strong independent risk factors of NAFLD^{1,2}. NAFLD is a histological continuum encompassing stages ranging from isolated steatosis (NAFL) to non-alcoholic steatohepatitis (NASH), characterized by lobular inflammatory infiltrates, hepatocyte ballooning and cell death, to fibrosis and ultimately cirrhosis³. NASH development results from complex interactions of metabolic and stress pathways in hepatocytes, initiated by chronic excessive lipid accumulation, with inflammatory processes driven by various immune cell populations, collectively inducing the histological picture of an active steatohepatitis¹. Several lesions can be present, but lobular inflammation and ballooning are the most relevant histological markers of NASH and their combination is referred to as NASH activity, clearly distinguishing the activity of the steatohepatitis from the feature of steatosis^{4,5}.

Ballooned hepatocytes are thought to be stressed and damaged cells (that lose their rectangular shape and swell due to cytoskeleton degeneration), possibly responding inadequately to pro-apoptotic and danger signals⁶.

Inflammatory infiltrates within the liver lobules are a hallmark of active steatohepatitis, and specialized immune populations, both resident and infiltrating, are linked with NASH⁷. Although certain circulating and hepatic immune populations have been associated with NASH⁸⁻¹⁰, a systematic and in-depth analysis of the cellular immune system in NASH is missing. Although current strategies to treat NASH target to reduce both lobular inflammation and ballooning^{11,12}, the molecular mechanisms underlining these components of NASH are poorly understood. Previous studies mainly aimed to identify molecular pathways correlated with NASH versus no NASH^{12,13}, without distinguishing steatosis from disease activity. Functional signatures associated with NASH and focusing on the activity that distinguishes

NASH from steatosis as such remain unexplored. Transcriptional signatures of NASH and its activity can be identified by comparing liver transcriptomics from patients with histologically proven lobular inflammation and ballooning versus patients with simple steatosis as well as by longitudinally assessing regression of NASH upon lifestyle intervention (LSI) or bariatric surgery (BS), which can lead to NASH resolution^{14,15}.

Using systems biology and experimental approaches, we set out to identify gene sets associated with NASH presence and activity at baseline and reversible in patients displaying reduced ballooning and lobular inflammation upon LSI. We identified a NASH transcriptomic signature strongly enriched in genes controlling immune inflammatory processes, antigen presentation and cytotoxic cells. We further show that NASH activity is associated with altered blood immune cell populations, including conventional dendritic cell (cDC) subsets and cytotoxic CD8 T cells. Moreover, in an obesity-driven mouse model of NASH exhibiting profound liver inflammation and hepatic damage, we also found increased hepatic expression of genes from the NASH transcriptomic signature, and altered hepatic populations of cDC and CD8 T cells. These results show that distinct immune cell populations play an important role in NASH activity and therefore constitute targets for NASH therapy.

Results

NASH associates with a hepatic immune-related gene module

Using transcriptome data¹⁶, we first searched for groups of genes with hepatic expression patterns linked with NASH in a large cohort of obese patients with or without histologically proven NASH (Supplementary Table 1). To this end, weighted gene co-expression network analysis (WGCNA), a method allowing identification of clusters (modules) of co-expressed genes with similar expression patterns in different experimental conditions, was used¹⁷. WGCNA of the approximately 30% most variable hepatic transcripts across patients identified

9 co-expressed gene modules (Fig. 1a,b and Supplementary Table 2). To assess whether these gene modules linked with NASH, we first analyzed alterations in the modules' expression in response to improvement in NASH activity in patients with NASH at baseline and in whom a liver biopsy was available 1 year after Roux-en-Y gastric bypass (RYGB) (n=21, Supplementary Table 3). In agreement with the reported effects of RYGB on NAFLD¹⁵, steatosis, lobular inflammation, and ballooning were significantly reduced in these patients at 1 year after RYGB (Supplementary Table 3). Interestingly, RYGB resulted in a significant alteration in transcriptional activity of 4 gene modules at follow-up compared to baseline (Fig. 1c). To decipher which gene modules are associated with common mechanisms of NASH regression, rather than with transcriptional alterations in the liver due to body weight loss, we tested these modules in LSI responders (patients with NASH at baseline who decreased lobular inflammation and/or ballooning at 1 year follow-up, for details see methods) and LSI non-responders in terms of NASH activity reduction, but who showed similar body weight loss at 1 year follow-up (Supplementary Table 4). Among the 4 gene modules affected by RYGB, only module "blue" displayed significant down-regulation at follow-up versus baseline in LSI responders, whereas its expression pattern hardly changed in non-responders (Fig. 1c-d). As overall gene expression levels in module "blue" were similarly decreased in RYGB patients and LSI responders, but not in LSI non-responders (Fig. 1c-d), this module is associated with reduction of NASH activity, independent of body weight changes. Indeed, the change in module blue expression was not correlated with % body weight (BW) change in either LSI or BS groups (Supplementary Fig 1b).

Module "blue" included 786 transcripts (Supplementary Table 2) and was significantly enriched for inflammation-related pathways, such as complement, TNF α and interleukin (IL)-6 signaling, as well as KRAS signaling, coagulation and apoptosis (Fig. 1e). Moreover, fasting plasma insulin and CRP levels were also associated with module "blue" expression,

highlighting the close link between insulin resistance, systemic inflammation and NASH (Supplementary Fig 1c). Among the 786 transcripts in module “blue”, 507 were significantly down-regulated at 1 year follow-up, including 195 transcripts significantly down-regulated in both RYGB patients and LSI responders, but not in LSI non-responders, with other transcripts being preferentially decreased in RYGB patients (93 genes) or LSI responders (187 genes) (Fig. 1f). Most of these genes were related to immune system functions, including pro-inflammatory cytokines and chemokines, cytotoxic cells, infiltration of immune cells into tissues, and major histocompatibility complex (MHC) I and II antigen presentation (Fig. 1f). Interestingly, among key IFN α -responsive genes (*IFIT1*, *OAS1*, *MIX1* and *ISG15*), only *MX1* showed a modest, non-significant association with NAFLD severity at baseline and *IFIT1* was significantly increased and *ISG15* decreased only after RYGB (Supplementary Fig 1d-e).

To determine whether module “blue” is associated with NASH and its severity in terms of activity at baseline, we correlated the expression levels of its transcripts with the NASH activity index (AI, sum of lobular inflammation and ballooning score) in the 155 patients. Importantly, many genes from module “blue”, including immune-related genes, associated positively with AI (Fig. 1g), suggesting links with NASH disease activity. Moreover, some of these genes were also decreased in RYGB patients or LSI responders at 1 year follow-up (Fig. 1f). In addition, hepatic expression levels of some of these immune-related genes, for instance chemokine (C-X-C motif) ligand (CXCL) 9 and 10, and lysozyme (LYZ), were significantly higher in NASH versus NAFL patients at baseline (Fig. 1h). Taken together, these results indicate that NASH regression associates with the response of a specific gene module, containing multiple co-regulated genes involved in inflammation, antigen presentation, cytotoxic response, and activation of T cells.

Blood immune cells signatures of NASH

As the gene module “blue” identified the immune system as a key player in NASH regression

upon LSI, we next assessed whether blood immune cells correlate with the presence of NASH and with its activity by performing a deep immunophenotyping analysis in patients without (n=17) or with NASH (n=21), stratified for T2D, a major risk factor for NASH (Supplementary Table 5). All patients were obese, with the highest BMI in the no-NASH T2D group. Patients with T2D were also older than patients without T2D. Although lobular inflammation was absent, the level of steatosis was already higher in the no-NASH T2D group compared to no-NASH no-T2D group and a few patients featured some ballooning (Supplementary Table 5), indicating that early stages of hepatocyte damage are already present in these patients.

Flow cytometry analysis of blood immune populations was performed in these 38 patients and correlations assessed between the 39 measured immune cell populations and clinical parameters (Fig. 2a, Supplementary Fig. 2). Unsupervised hierarchical clustering grouped immune cell populations based on similarity of their correlation patterns with clinical parameters for NASH and glucose metabolism and yielded three main clusters. Cluster 1 associated with NASH but showed weak or absent correlations with T2D; Cluster 2 positively associated with NASH and T2D and Cluster 3 negatively correlated with most parameters specific for NASH and T2D (Fig. 2a). Within Cluster 1, NASH activity positively correlated with NK cells, atypical CD16⁺⁺ monocytes and *HLA-DR⁺CD123⁻CD11c⁺CD141⁻* cells, similar to classical dendritic cells type 2 (cDC2). Likewise, Th1 lymphocytes and NKT cells were positively associated with lobular inflammation, ballooning and NASH AI. Immune cell populations within Cluster 2 were positively associated with lobular inflammation, ballooning, and with glucose or HbA1c levels, thus linking NASH activity and T2D (Fig. 2a). Cluster 2 included pro-inflammatory CD16⁺ monocytes and IL-10⁺ CD4 T lymphocytes, the latter likely reflecting a compensatory anti-inflammatory response to increased disease activity, as previously described in mice¹⁸. Interestingly, within Cluster 2 we also found activated and

cytotoxic CD8 T lymphocytes correlating with NASH activity (Fig. 2a). CD8 T cells appear to be functionally linked to hepatic damage and inflammation in mouse models of NASH^{10,19,20}, but have not been well studied in human NASH. Cluster 3 immune cell populations were mostly negatively associated with NASH and glucose parameters. Among them, are Th2 lymphocytes, including IL-5⁺ cells, as well as regulatory T cells (Treg). While cDC2 were positively associated with NASH (Cluster 1), both *HLA-DR⁺CD123⁻CD11c⁺CD141⁺* cDC1 and *HLA-DR⁺CD123⁺* plasmacytoid DC (pDC) were inversely correlated with NASH and glucose levels (Cluster 3). This indicates that pDC, cDC1, and cDC2 may play opposing roles in NASH. These results show that both NASH and T2D are associated with pronounced changes in blood immune cell populations, which may contribute to the high incidence of NASH in T2D.

Blood immune populations correlate with liver gene signature

Analysis of hepatic transcriptome and blood immune cell populations suggest that interplay between antigen-presenting cells (likely cDC), CD4 T cells and cytotoxic lymphocytes is linked with the presence and activity of NASH. We thus probed for correlations between blood immune cell populations and expression levels of genes from the NASH transcriptomic signature (module “blue”) in the 28 patients with both liver microarray and blood flow cytometry data. CD16⁺ monocytes correlated with elevated expression of immune and stress genes from module “blue” (Fig. 2b). cDC1 and cDC2 oppositely linked with NASH activity (Fig. 2a) and cDC1, but not cDC2, displayed negative associations with hepatic expression of genes involved in immune regulation and antigen presentation (Fig. 2b and data not shown). Interestingly, elevated IL-10⁺ CD4 T cells were linked with increased hepatic expression of genes related to inflammation, chemotaxis, and cytotoxic responses (Fig.2b), again indicative of a possible compensatory increase of immunoregulatory IL-10 expression in CD4 T cells in NASH. Finally, we tested correlations between genes from module “blue” and cytotoxic CD8 T

cells expressing perforin (strongly associated with NASH activity and T2D) (Fig. 2a,b). This immune cell population showed associations with hepatic genes related to cytotoxic and IFN γ responses (GZMA, CD226, IRF1), T helper differentiation (ITK), and TNF α signaling (TNFAIP2) (Fig. 2b). Taken together, these results show a remarkable similarity and associations between hepatic immune pathways predicted by gene module “blue” and the repertoire of NASH-associated immune populations in the blood. These data suggest a cross-talk between immune cells and hepatocytes, likely via cytokines, and direct infiltration of immune cells into the liver.

Diet-induced NASH drives increased liver cDC2 and CD8 T cells

Next, we assessed whether lifestyle-induced NASH leads to hepatic accumulation of the immune cell populations identified in the clinical study, such as cDC and cytotoxic cells. Since disease-inducing protocols are unethical and flow cytometric analysis of hepatic immune populations in humans is challenging due to the limited tissue access, we studied liver immune cells in a diet-induced model of murine NASH. Most published NASH models used to analyze hepatic immune cells do not develop obesity² and hepatic immune populations have not yet been characterized in two published mouse models of obesity-associated NASH^{21,22}. The diet-induced NASH model recapitulated the main known dietary drivers of this disease in humans^{23,24} and displayed hallmarks of well-established NASH, such as steatosis, hepatocyte damage, and lobular inflammatory infiltrates (Supplementary Fig. 3 and Supplementary Information). Flow cytometric analysis of mouse liver showed unaltered neutrophil population and decreased proportions of B lymphocytes and CLEC4F⁺ Kupffer cells, whereas inflammatory macrophages and monocytes were increased in livers of mice with NASH (Supplementary Fig. 4a-f). Hepatic NK, NKT, and CD4 T cells were not affected upon NASH induction, whereas hepatic FOXP3⁺ Treg cells tended to be elevated (Supplementary Fig. 4g-j).

Systems biology analysis in humans predicted an important role of hepatic antigen-presenting cDC and cytotoxic cells in NASH regression upon LSI (Fig. 1f). Interestingly, mouse CD172a⁺ cDC, phenotypically similar to human cDC2, were significantly increased in mouse livers upon NASH induction (Fig. 3a,b). In contrast, NASH induction in mice led to a decrease of hepatic XCR1⁺ cDC (analogous to human cDC1) (Fig. 3a,c), driving a marked decrease in the cDC1/cDC2 ratio (Fig. 3d). This shift in cDC populations was specific to the liver, as no changes were found in these cDC subsets in the spleen (data not shown). Moreover, the proportion of CD8 T cells was significantly increased in livers of mice with NASH (Fig. 3e,f), suggesting that hepatic accumulation of CD8 T cells may be linked with antigen presentation by CD172a⁺ cDC2. These results in a lifestyle-induced NASH model corroborate the hepatic NASH gene expression and blood immune signatures in humans and indicate that hepatic accumulation of CD8 T cells and disturbance in hepatic cDC are main immune hallmarks of NASH activity and progression.

Finally, we studied hepatic expression of inflammatory cytokines and chemokines in the diet-induced NASH model. NASH induction increased expression of TNF α , macrophage colony-stimulating factor (CSF)1, IL23A, IL33, C-C motif chemokine ligand (CCL)2, and CXCL10 (Fig. 3g), the latter four genes present in the gene expression signature of NASH responsive to intervention (Fig. 1f). IFN α -responsive genes *Iffit1* and *Oas1a* were also induced in ND compared to CD fed mice (Supplementary Fig 3g). These data indicate that this diet-induced NASH model in mice affects the same hepatic immune populations and inflammatory pathways that are modified upon regression of NASH activity induced by LSI in humans.

Activated CD8 T cells are elevated in NASH and T2D in humans

Given that both gene expression analysis in human livers and flow cytometric analysis in mouse livers revealed an association of cytotoxic CD8 T cells with obesity-related NASH, we

next focused on these cells to better understand their potential role in NASH in humans. Indeed, both NASH and T2D enhanced the proportions of IFN γ ⁺ and TNF α ⁺ circulating CD8 T cells (Fig. 4a). Cytotoxic functions of CD8 T cells were also increased both in NASH and T2D as evidenced by increased expression of granzyme A and B, and perforin (Fig. 4b,c). Because T2D is a major risk factor for NASH, its effects towards CD8 T cells may link these diseases. Indeed, in the absence of NASH (no-NASH T2D group), T2D was associated with elevated expression of IFN γ , TNF α and cytotoxic molecules in CD8 T cells and some of these patients already displayed steatosis and ballooning. These results show that both NASH and T2D patients have a blood signature of increased populations of activated and cytotoxic CD8 T cells, which may link these diseases.

Hepatic CD8 T cells correlate with NASH in human liver

Finally, we investigated whether the increase of circulating cytotoxic CD8 T lymphocytes in obese NASH patients is accompanied by an accumulation of these cells in the liver. CD8-positive cells with lymphoid morphology were detected on sections from all groups of patients (Fig. 5a). While both NASH and T2D were both associated with significantly increased levels of CD8 T lymphocytes in the liver, no further increase was observed in NASH T2D patients (Fig. 5b). CD8 T lymphocytes localised within inflammatory foci in the parenchymal compartment in close proximity to steatotic and ballooned hepatocytes (Fig. 5c). Liver CD8 T lymphocyte numbers showed relatively little association with steatosis, but significantly correlated with lobular inflammation, ballooning, and AI (Fig. 5d). No significant correlation was found between liver CD8 T lymphocytes and glucose levels or HbA1c (data not shown), suggesting that the T2D-associated accumulation of CD8 T lymphocytes is not driven by dysfunctional glucose metabolism. Notably, liver CD8 T lymphocytes significantly correlated with blood CD8 T lymphocytes and with the subset of perforin-expressing CD8 T cells (Supplementary Fig. 5a). Hepatic CD8 T cells also significantly correlated with expression of

perforin (PRF1) and granzyme A (GZMA) in the liver, two cytotoxic genes from the module “blue”, but not granzyme B (GZMB) and granulysin (GNLY) (Supplementary Fig, 5b). Finally, we found that hepatic CD8 T cells positively correlated with expression levels of multiple genes from module “blue”, including genes related to T cells (CD2, CD226), cytotoxic responses (KLRC4-KLRK1), and MHCII-mediated antigen presentation (HLA-DQB1) (Fig. 5e). Interestingly, the strongest correlation with hepatic CD8 T cells was observed for PTPN22 (protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 22), which controls T cell receptor responsiveness and is associated with inflammatory and autoimmune diseases in humans²⁵. Taken together, these results indicate that disease activity (lobular inflammation and ballooning) in NASH is associated with the accumulation of CD8 T lymphocytes in the liver. Moreover, hepatic CD8 T cells are linked to an increased expression of genes from the signature of active NASH. Thus, hepatic gene expression and immune signatures of NASH activity regression reveals CD8 T cells as a potential target to control hepatic inflammation, cytotoxic responses in the liver and NASH activity.

Discussion

The global epidemic of NASH is an important health problem, as effective pharmacological approaches to treat NASH are not yet available. LSI and BS are the best available strategies to reduce NASH activity in some patients^{14,15,26}. Here, we identify a hepatic transcriptomic signature of NASH in humans distinct from NAFL and responsive to RYGB and LSI, suggesting a shared mechanism of NASH regression by these different weight loss methods. Interestingly, weight loss alone was apparently not sufficient to improve NASH in all patients as weight loss was similar in LSI responders and non-responders. The reversible transcriptomic signature of NASH is highly enriched by immune genes such as cytokines and chemokines and their receptors, genes involved in activation of lymphocytes by antigen-presenting cells, and genes linked to cytotoxic cells. Some of these genes have already been

described as associated with NASH. For example, CD44, a molecule mediating leukocyte recruitment into the liver, plays a role in methionine-choline deficient dietary (MCD)-induced NASH in preclinical models²⁷. Though the MCD model has obvious limitations in representing human NASH within the framework of the metabolic syndrome, it reproduces NASH in its hepatic phenotype and is therefore an interesting model to study intrahepatic changes in NASH. Furthermore, the same study also found elevated CD44 in human NASH biopsies. The pro-inflammatory cytokine CXCL10 also drives NASH in the MCD NASH model and is increased in blood from NASH patients²⁸. Here we show that down-regulation of hepatic pro-inflammatory pathways accompanies regression of NASH activity upon intervention in patients. Moreover, these pathways increase upon lifestyle induction of NASH in a mouse model. Thus, the reversible transcriptomic signature of NASH reveals new biological targets for specific therapy of NASH focusing on its activity. While the present study focuses on weight-loss or lifestyle modification driven NASH improvement, effective pharmacological treatments could target this immune signature and act in synergy with other, metabolism-focused pathways. Because the transcriptomic analysis here was performed on total RNA from liver biopsies, it is conceivable that single-cell RNA analysis may reveal more subtle differences in hepatocyte vs non-parenchymal cell responses in NASH.

Increasing evidence demonstrates a close interaction between the immune system and metabolism in the development of NASH²⁹. Our data are in line with recent publications on associations of different immune cells with NAFLD in humans^{8,9,30,31}. However, this is the first study in which a global analysis of circulating immune cell populations in relation to the presence of NASH and its severity was performed. Integrative analysis revealed a species-conserved phenotype of NASH implicating antigen-presenting cDC sub-types and cytotoxic CD8 T cells. Whereas cDC1 are thought to present antigens to CD8⁺ T cells and cDC2 present antigens to CD4⁺ T cells^{32,33}, we surprisingly found blood cDC1 correlate inversely

with NASH activity and blood cDC2. Similarly, CD172a⁺ cDC2 replace XCR1⁺ cDC1 in mouse livers upon NASH induction. Moreover, elevated hepatic expression of multiple genes involved in antigen presentation in NASH is reversible upon intervention. In the MCD model, total cDC have been shown to protect against NASH³⁴. However, whether these effects are mediated by cDC1 and/or cDC2 sub-populations is unclear. As cDC subtypes control pro-inflammatory and tolerogenic immune responses depending on the tissue environment³⁵, a shift between cDC1 and cDC2 in mice and humans might be associated with elevated hepatic inflammation and hepatocyte damage in NASH. Interestingly, depletion of CD141⁺ cDC1 has been shown to occur in human liver upon inflammation³⁶, suggesting an inflammation-mediated mechanism of suppression of cDC1 in relation to NASH activity. Among the hepatic myeloid populations identified in mice (i.e. Kupffer cells, monocyte-derived macrophages, DC, etc.), the present gating strategy was unable to exhaustively phenotype these clearly important immune populations. Further studies are thus necessary to better understand the evolution of the hepatic immune milieu and confirm our findings in human NASH biopsies.

Previous studies demonstrated associations of CD8 T cells with liver damage in mouse models of NASH^{10,19,20}. We show that, in patients, circulating and hepatic cytotoxic CD8 T lymphocytes are significantly linked to histological hallmarks of NASH, such as lobular inflammation and ballooning. Moreover, CD8 T lymphocytes correlate with hepatic markers of inflammation and antigen presentation in NASH. Polymorphisms in one of these genes, HLA-DQB1, a MHCII haplotype, is associated with NAFLD^{37,38}. Another gene, PTPN22, is an important regulator of T-cell receptor (TCR) signaling and linked with several autoimmune diseases²⁵. Furthermore, in the lifestyle-induced NASH model, elevated hepatic CD8 T cells associated with CD172a⁺ cDC2, suggesting a possible role of antigen-presentation and TCR activation of CD8 T cells in NASH. CD8 T lymphocytes appear to contribute to insulin resistance in a mouse model of diet-induced obesity³⁸. Similarly, hepatic CD8 T lymphocytes

and type I IFN signaling promote glucose intolerance and insulin resistance in mice^{39,40}. Interestingly, the reversible transcriptomic signature of NASH that we identified is enriched by cytokines and cytotoxic molecules in circulating CD8 T cells is linked to NASH activity and T2D in humans. Curiously, dysregulated glucose metabolism in T2D patients does not explain the increased numbers of CD8 T cells in the liver, suggesting that other factors contribute to the T2D-mediated accumulation of hepatic CD8 T cells. Moreover, in addition to elevated hepatic CD8 T cells, some T2D patients, without an unequivocal NASH diagnosis, already display ballooning. Together, these results suggest a role of CD8 T cells in the interplay between T2D and NASH. We found that the reversible transcriptomic signature of NASH is enriched by apoptosis pathway and NF- κ B target genes (data not shown). These hepatic NF- κ B target genes are down-regulated upon NASH activity reduction accompanied by decreasing ballooning. Ballooning is a poorly understood but essential hallmark of NASH, representing a specific form of “undead cells” with features of initiated but not resolved apoptosis⁶. Because the apoptotic machinery is controlled by the NF- κ B signaling pathway⁴¹, down-regulation of the pathway upon LSI or BS might resolve apoptosis and thereby eliminate ballooned cells from the liver. Moreover, associations of the blood immune signature of NASH, particularly cytotoxic CD8 T cells, with ballooning suggest a cross-talk between the immune system and stressed hepatocytes in NASH. Although our results identify a pathway contributing to NASH resolution in a manner independent of body weight, it is clear that metabolic control through direct action on the liver or via extra-hepatic organs also contributes to NAFLD. Indeed, adipose tissue may directly contribute to NAFLD progression through systemic cytokine and immune signaling and drive hepatic injury in the context of obesity^{39,42,43}.

Taken together, our study provides insights in the molecular mechanisms implicated in NASH and its regression upon intervention. In patients and a mouse model, we comprehensively

and consistently show surprisingly pronounced associations of immune pathways and cell populations with NASH activity. These pathways, as well as the exact molecular targets revealed by this study, underline an important role of innate and acquired immunity in the development and severity of NASH, which may be targeted for treatment.

Materials and Methods

Patients

All patients were consecutively recruited at the Liver Clinic and Obesity Clinic of the Antwerp University Hospital and underwent hepatologic and metabolic work-ups. Blood analysis included blood cell count and white blood cell formula. 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, simple steatosis n=22, NASH n=106) were selected from a cohort recruited since 2006¹⁶. Selected obese NASH patients with paired biopsies at 1 year follow-up (LSI n=20, Roux-en-Y Gastric Bypass (RYGB) n=21) were included for gene expression analysis (Figure S1). For immunophenotyping analysis, patients (n=38) were consecutively recruited between 2014 and 2016. Gene expression analysis was performed on a subset of these patients (n=29) who were included in the baseline gene expression analysis (Figure S1). 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.

Selection of patients

Among patients visiting the Obesity Clinic at the Antwerp University Hospital recruited from 2006 to 2016, 155 patients with hepatic RNA microarray and clinical data available at baseline were enrolled^{16,44}. Among the 155 patients, 41 obese non-diabetic patients with NASH at baseline were selected for comparative baseline and 1 year follow-up hepatic RNA

microarray and clinical data analysis. Among these 41 patients with NASH at baseline, 31 patients displayed an improvement in disease activity, with decreases of lobular inflammation and/or ballooning, one year after RYGB (n=21) or LSI (n=10), whereas 10 patients did not improve one year after LSI. We defined the LSI patients with NASH at baseline who improved ballooning and/or lobular inflammation at 1 year follow-up as responders to and the LSI patients with NASH at baseline who did not improve ballooning and/or lobular inflammation at 1 year follow-up were classified as non-responders to intervention. In a second independent cohort, immune cell populations were analysed in consecutive patients with 4 clearly distinct phenotypes enrolled based on their metabolic (T2D) and histological (NASH) phenotype (total n=38): 17 patients without NASH in which some degree of simple steatosis was allowed (without (n=7) and with (n=10) T2D) and 21 patients with unequivocal NASH based on histological parameters (without (n=11) and with (n=10) T2D). The group without T2D and NASH consisted of a slightly lower number of patients, as liver biopsies were only performed on clinical indication of potential presence of NASH. High quality RNA appropriate for microarray analysis was obtained from liver biopsies in 29 out of 38 patients (13 patients without NASH and 16 patients with NASH).

Clinical assessment and biological measurements

Fasting blood glycaemia was analysed in the morning. A 2 hour oral glucose tolerance test (OGTT) (75 g of glucose), including insulin quantification, was performed. HOMA-IR was calculated⁴⁵. BMI, glucose, and %HbA1c were measured⁴⁶. Liver biopsies were performed for suspected NAFLD as indicated by elevated serum transaminase levels or a steatotic liver on ultrasound as described previously⁴⁴.

Histological assessment of the liver biopsies

All liver biopsies were stained (haematoxylin-eosin, Sirius red, reticulin and Perls' iron stain) and scored by two expert pathologists blinded to all clinical information. Histological features

of NAFLD (steatosis, ballooning, lobular inflammation and fibrosis) were assessed using the NASH Clinical Research Network Scoring System criteria⁴⁷. The NAFLD Activity Score (NAS) was calculated as the sum of steatosis, lobular inflammation and ballooning scores. An activity index (AI) was also calculated as the sum of ballooning (range 0-2) and lobular inflammation (range 0-3) in line with recent observations of the distinct roles of steatosis versus activity of disease⁵. NASH was defined by the simultaneous presence of steatosis ≥ 1 AND ballooning ≥ 1 AND lobular inflammation ≥ 1 ⁴⁷. As outlined, the sum of ballooning and lobular inflammation was calculated and indicated as AI.

Mouse model of diet-induced NASH

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 hr light/dark cycle, 21°C-24°C) with *ad libitum* access to water and food. Alternatively, Foxp3-YFP reporter mice⁴⁸ maintained on a C57BL/6J background were used to monitor hepatic Treg populations. Littermate animals were randomized by body weight prior to the start of the diet. No power calculations were performed to determine sample size. Mice were fed either a control diet (CD, standard rodent chow, 5% kcal fat) or a “NASH” diet (ND, 45% kcal fat, 40% kcal carbohydrate, 15% kcal protein with 1% (by weight) cholesterol; SAFE diets, Augy, France) for 24 weeks. All experiments were performed following approval by the Ethics Committee for Animal Experimentation from Nord-Pas de Calais Region (APAFIS#5746-2016040109244171 and APAFIS#7160-2017040313471173).

Histology and immunohistochemistry

Human liver biopsy sections were incubated for 1hr at 22°C with rabbit monoclonal anti-CD8a (SP16) (Thermo Fisher Scientific), followed by staining with a mouse anti-rabbit HRP-conjugated antibody, and revealed with Vector ImmPRESS HRP Reagent Kit and Vector NovaRED Substrate Kit. Sections were counterstained by haematoxylin. Mouse liver samples

were fixed with 4% PFA, embedded in paraffin and stained with haematoxylin-eosin. Images were obtained by conventional microscopy using a Nikon Ti-U microscope.

Flow cytometry

EDTA blood samples from patients were collected and peripheral blood mononuclear cells (PBMC) isolated using Percoll. For cytokine staining, cells were incubated with 20ng/ml PMA, 1µg/ml ionomycin and 1 µg/ml brefeldin A in RPMI medium for 4hr at 37°C, 5% CO₂. 1×10⁶ PBMC were pre-incubated with Fc-block to minimize non-specific binding and labeled with conjugated antibodies CD3 (UCHT1, PE-CF594), CD4 (OKT4, APC-CY7), CD45RA (HI100, V500), CD56 (HCD56, BV605), CD8 (HIT8a, PE-CY7), CCR10 (6588-5, PE), CD11b (ICRF44, AF700), CD11c (3.9, PB), CD123 (6H6, PE-CY7), CD127 (A7R34, BV605), CD14 (HCD14, PerCP-CY5.5), CD141 (B-A35, FITC), CD16 (3G8, V500), CD161 (HP-3G10, PB), CD172a (15-414, APC), CXCR3 (G025H7, APC), CD19 (HIB19, PE-CF594), CCR6 (R6H1, PE), CD197/CCR7 (3D12, FITC), HLA-DR (G46-6, AF700 or APC-CY7), Perforin (dG9, PE), Granulysin (DH2, AF647), Granzyme A (CB9, AF700), Granzyme B (GB11, PB), TNF (MAb11, AF700), IFN γ (4S.B3, BV421), IL-10 (JES3-9D7, eFluor660), IL-17A (BL168, AF700), IL-22 (22URTI, eFluor660), IL-5 (TRFK5, APC). Intracellular staining was performed using the Cytotfix/Cytoperm kit (BD Biosciences) according to the manufacturer's instructions. Immune cells were isolated from mouse liver, digested 45 min with collagenase D, using centrifugation with 30% Percoll. Cells were treated with Zombie UV to discriminate live and dead cells, incubated with Fc-block and labelled with conjugated antibodies: CD45 (BUV737, clone 104), CD11b (BUV395, clone M1/70), CCR2 (BV421, clone SA203G11), Ly6C (BV785, clone HK1.4), F4/80 (BV711, clone BM8), NK1.1 (AF700, clone PK136), CD4 (BV605, clone RM4-5), CD8a (BV510, clone 53-6.7), Ly6G (PE-Cy7, clone 1A8), IA/IE (BV650, clone M5/114.15.2), CD11c (APC-Cy7, clone N418), CD19 (PE-CF594, clone 1D3), TCRb (APC, clone H57-597). For myeloid cell staining, an additional panel was used with the following

antibodies: CD45 (PE-CF594, clone 30-F11), CD172a (BUV395, clone P84), CCR2 (BV421, clone SA203G11), B220 (BV510, RA3-6B2), CD26 (BV605, clone H194-112), XCR1 (BV650, clone ZET), F4/80 (BV711, clone BM8), Ly6C (BV786, clone HK1.4), MHCII (FITC, clone M5/114.15.2), CD64 (PE, clone x54-5/7.1), CLEC4F (PE-Cy7, clone #370901), CD19 (APC, clone eBio1D3), CD3 (AF700, clone 500A2), NK1.1 (AF700, clone PK136), CD11c (APC-Cy7, clone N418). The CLEC4F antibody was coupled to PE-Cy7 using the Abcam Antibody Coupling Kit (ref: ab102903) and used at a final dilution of 1:100.

Flow cytometry analysis was performed on a BD LSRFortessa X-20 (Becton Dickinson). Results were acquired with the Diva software (Becton Dickinson) and analysed using FlowJo software (Tree Star). Additional details are provided in the Reporting Summary.

RNA extraction

For human samples, the entire biopsy was homogenized for RNA extraction, purification, and processing as described previously⁴⁴. Total RNA was isolated from mouse liver using Trizol reagent and used for reverse transcription and real-time PCR. RNA from human liver biopsies was isolated using RNeasy Mini Kit (Qiagen) and used for microarray analysis. Quantification and RNA integrity number (RIN) was tested using the Agilent 2100 Bioanalyzer System. Only RNA samples with RIN \geq 6 were used for microarray analysis.

Reverse transcription and real-time PCR

Total RNA (500 ng) isolated from mouse liver was treated with DNase I and used to generate cDNA with High-capacity cDNA reverse transcription kit. Gene expression was measured by SybrGreen based real-time PCR. Results were normalized to the normalization factor calculated as average expression of housekeeping genes *Ppia* and *Tbp*, and the $\Delta\Delta$ Ct method was used for all real-time PCR analyses. Primers sequences are provided in Supplementary Table 6.

Microarray analysis

Transcriptome analysis was performed with the Affymetrix GeneChip HuGene 2.0 ST arrays^{16,49}. All liquid handling procedures were performed on a GeneChip Fluidic Station 450. GeneChips were scanned with a GeneChip Scanner 3000-7G (Affymetrix) using Command Console v4.1.2. Quality controls were performed using the Affymetrix expression console.

Microarray data processing and WGCNA

Microarray data were normalized by the robust multi-average (RMA) method⁵⁰ using oligo/Bioconductor and corrected for batch effects using SVA/Bioconductor R packages⁵¹. 38598 annotated transcripts were selected for analysis. 11784 transcripts with maximal variability across all patients at baseline (n=155) based on median absolute deviation were selected for WGCNA and tested using the WGCNA R package¹⁷. Biweight midcorrelations and weighted adjacency matrix were calculated using the power 11 selected based on the scale-free topology fit model. Gene modules were identified using the "hybrid" method, and parameters deepSplit=4 and mergeCutHeight=0.15. For creation of volcano plots, log₁₀ P-values and log₂ fold changes were calculated using the limma R package⁵². Selected sets of transcripts of gene modules were tested for differential expression with geneSetTest from the limma R package⁵³. Gene Expression Omnibus (GEO) repository accession number for microarray data is GSE106737. Gene set enrichment analysis of gene modules was performed using GSEA software (<http://software.broadinstitute.org/gsea/>).

Statistical analysis

No statistical method was used to predetermine the sample size. For animal studies, mice were randomized by body weight prior to dietary challenge and no blinding was performed for subsequent analysis. For comparison in patients at baseline and one year after BS or LSI, the paired moderated t-test or the paired Mann-Whitney *U*-test was used. For comparison of the

four groups of patients, data were analysed by two-way ANOVA, using NASH and T2D as factors, followed by Tukey's *post-hoc* test for multiple comparisons. For histological quantification of hepatic CD8+ cells, the observer was blinded from the clinical parameters of each patient. Parametric Pearson correlation (continuous data) or non-parametric Spearman's rank-order correlation (categorical data) and hierarchical clustering were performed using R. Gene networks were visualized using Cytoscape. P-values <0.05 were considered significant. P-values were adjusted using Benjamini-Hochberg procedure. Statistical analyses were performed with Prism 6 (GraphPad Software, Inc.) or R version 3.4.4.

Data and materials availability: Microarray data used in this study – GSE106737. Requests for other data should be made to the corresponding author.

Acknowledgements and Funding: This work was supported by grants from the ANR and the European Union: EGID ANR-10-LABX-46 & Fondation Leducq LEAN 16CVD01 (to BS, DD, PL), ANR-18 NASHILCCD8 (to BS, DD) FP6 HEPADIP LSHM-CT-2005-018734 (to BS, AV, LVG, and SF) and FP7-HEALTH RESOLVE 305707 (to BS, AV, LVG and SF). SF is recipient of Flanders Fund for Scientific Research (FWO klinisch mandaat 1802154N). BS is a recipient of an Advanced European Research Council (ERC) grant (number 694717). JTH was supported by an EMBO Long Term Fellowship (ALTF277-2014).

Author contributions: LV and SF collected human biopsies, histological and biochemical data. LV, SF, LVG and AV supervised human biopsies collection and analysis. AnD performed the histology of the liver biopsies. JTH and DAM performed mouse experiments, flow cytometry, immunological and transcriptomic analysis, and WGCNA. SebF performed immunohistochemistry. BD, HD, CG, PL performed microarray analysis. AuD, AN, EW, LDG and SP performed mouse experiments and flow cytometry. DAM, LV, JTH, SF, BS and DD,

conceived the study, interpreted data and wrote the manuscript. DAM, LV and JTH are joint first authors who equally contributed to the work. BS, SF, and DD are senior authors who equally contributed to the work. LV and DD are joint corresponding authors.

Competing interests: BS and SF are consultants for Genfit S.A. SF and LV are consultants for Inventiva. All other authors have nothing to declare.

References

- 1 Haas, J. T., Francque, S. & Staels, B. Pathophysiology and Mechanisms of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Annu Rev Physiol* **78**, 181-205, doi:10.1146/annurev-physiol-021115-105331 (2016).
- 2 Luyckx, F. H., Lefebvre, P. J. & Scheen, A. J. Non-alcoholic steatohepatitis: association with obesity and insulin resistance, and influence of weight loss. *Diabetes Metab* **26**, 98-106 (2000).
- 3 Brunt, E. M. Pathology of nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **7**, 195-203, doi:10.1038/nrgastro.2010.21 (2010).
- 4 Brunt, E. M. *et al.* Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) activity score and the histopathologic diagnosis in NAFLD: distinct clinicopathologic meanings. *Hepatology* **53**, 810-820, doi:10.1002/hep.24127 (2011).
- 5 Bedossa, P. *et al.* Histopathological algorithm and scoring system for evaluation of liver lesions in morbidly obese patients. *Hepatology* **56**, 1751-1759, doi:10.1002/hep.25889 (2012).
- 6 Hirsova, P. & Gores, G. J. Ballooned hepatocytes, undead cells, sonic hedgehog, and vitamin E: therapeutic implications for nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* **61**, 15-17, doi:10.1002/hep.27279 (2015).
- 7 Vonghia, L., Michielsen, P. & Francque, S. Immunological mechanisms in the pathophysiology of non-alcoholic steatohepatitis. *Int J Mol Sci* **14**, 19867-19890, doi:10.3390/ijms141019867 (2013).
- 8 Liaskou, E. *et al.* Monocyte subsets in human liver disease show distinct phenotypic and functional characteristics. *Hepatology* **57**, 385-398, doi:10.1002/hep.26016 (2013).
- 9 Rau, M. *et al.* Progression from Nonalcoholic Fatty Liver to Nonalcoholic Steatohepatitis Is Marked by a Higher Frequency of Th17 Cells in the Liver and an Increased Th17/Resting Regulatory T Cell Ratio in Peripheral Blood and in the Liver. *J Immunol* **196**, 97-105, doi:10.4049/jimmunol.1501175 (2016).
- 10 Wolf, M. J. *et al.* Metabolic activation of intrahepatic CD8+ T cells and NKT cells causes nonalcoholic steatohepatitis and liver cancer via cross-talk with hepatocytes. *Cancer Cell* **26**, 549-564, doi:10.1016/j.ccell.2014.09.003 (2014).
- 11 Kleiner, D. E. & Bedossa, P. Liver histology and clinical trials for nonalcoholic steatohepatitis-perspectives from 2 pathologists. *Gastroenterology* **149**, 1305-1308, doi:10.1053/j.gastro.2015.09.015 (2015).
- 12 Ryaboshapkina, M. & Hammar, M. Human hepatic gene expression signature of non-alcoholic fatty liver disease progression, a meta-analysis. *Sci Rep* **7**, 12361, doi:10.1038/s41598-017-10930-w (2017).
- 13 Moylan, C. A. *et al.* Hepatic gene expression profiles differentiate presymptomatic patients with mild versus severe nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* **59**, 471-482, doi:10.1002/hep.26661 (2014).
- 14 Vilar-Gomez, E. *et al.* Weight Loss Through Lifestyle Modification Significantly Reduces Features of Nonalcoholic Steatohepatitis. *Gastroenterology* **149**, 367-378 e365; quiz e314-365, doi:10.1053/j.gastro.2015.04.005 (2015).

- 15 Lassailly, G. *et al.* Bariatric Surgery Reduces Features of Nonalcoholic Steatohepatitis in Morbidly Obese Patients. *Gastroenterology* **149**, 379-388; quiz e315-376, doi:10.1053/j.gastro.2015.04.014 (2015).
- 16 Lefebvre, P. *et al.* Interspecies NASH disease activity whole-genome profiling identifies a fibrogenic role of PPARalpha-regulated dermatopontin. *JCI Insight* **2**, doi:10.1172/jci.insight.92264 (2017).
- 17 Langfelder, P. & Horvath, S. WGCNA: an R package for weighted correlation network analysis. *BMC Bioinformatics* **9**, 559, doi:10.1186/1471-2105-9-559 (2008).
- 18 Vonghia, L. *et al.* CD4+ROR gamma t++ and Tregs in a Mouse Model of Diet-Induced Nonalcoholic Steatohepatitis. *Mediators Inflamm* **2015**, 239623, doi:10.1155/2015/239623 (2015).
- 19 Bhattacharjee, J. *et al.* Hepatic Natural Killer T-cell and CD8+ T-cell Signatures in Mice with Nonalcoholic Steatohepatitis. *Hepatol Commun* **1**, 299-310, doi:10.1002/hep4.1041 (2017).
- 20 Sutti, S. *et al.* Adaptive immune responses triggered by oxidative stress contribute to hepatic inflammation in NASH. *Hepatology* **59**, 886-897, doi:10.1002/hep.26749 (2014).
- 21 Clapper, J. R. *et al.* Diet-induced mouse model of fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis reflecting clinical disease progression and methods of assessment. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **305**, G483-495, doi:10.1152/ajpgi.00079.2013 (2013).
- 22 Asgharpour, A. *et al.* A diet-induced animal model of non-alcoholic fatty liver disease and hepatocellular cancer. *J Hepatol* **65**, 579-588, doi:10.1016/j.jhep.2016.05.005 (2016).
- 23 Jensen, T. *et al.* Fructose and sugar: A major mediator of non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol* **68**, 1063-1075, doi:10.1016/j.jhep.2018.01.019 (2018).
- 24 Ioannou, G. N. The Role of Cholesterol in the Pathogenesis of NASH. *Trends Endocrinol Metab* **27**, 84-95, doi:10.1016/j.tem.2015.11.008 (2016).
- 25 Bottini, N. & Peterson, E. J. Tyrosine phosphatase PTPN22: multifunctional regulator of immune signaling, development, and disease. *Annu Rev Immunol* **32**, 83-119, doi:10.1146/annurev-immunol-032713-120249 (2014).
- 26 Froylich, D. *et al.* Effect of Roux-en-Y gastric bypass and sleeve gastrectomy on nonalcoholic fatty liver disease: a comparative study. *Surg Obes Relat Dis* **12**, 127-131, doi:10.1016/j.soard.2015.04.004 (2016).
- 27 Patouraux, S. *et al.* CD44 is a key player in non-alcoholic steatohepatitis. *J Hepatol* **67**, 328-338, doi:10.1016/j.jhep.2017.03.003 (2017).
- 28 Zhang, X. *et al.* CXCL10 plays a key role as an inflammatory mediator and a non-invasive biomarker of non-alcoholic steatohepatitis. *J Hepatol* **61**, 1365-1375, doi:10.1016/j.jhep.2014.07.006 (2014).
- 29 Tilg, H., Moschen, A. R. & Roden, M. NAFLD and diabetes mellitus. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **14**, 32-42, doi:10.1038/nrgastro.2016.147 (2017).
- 30 Syn, W. K. *et al.* Accumulation of natural killer T cells in progressive nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* **51**, 1998-2007, doi:10.1002/hep.23599 (2010).
- 31 Miura, K., Yang, L., van Rooijen, N., Ohnishi, H. & Seki, E. Hepatic recruitment of macrophages promotes nonalcoholic steatohepatitis through CCR2. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **302**, G1310-1321, doi:10.1152/ajpgi.00365.2011 (2012).
- 32 Durai, V. & Murphy, K. M. Functions of Murine Dendritic Cells. *Immunity* **45**, 719-736, doi:10.1016/j.immuni.2016.10.010 (2016).
- 33 Vu Manh, T. P., Bertho, N., Hosmalin, A., Schwartz-Cornil, I. & Dalod, M. Investigating Evolutionary Conservation of Dendritic Cell Subset Identity and Functions. *Front Immunol* **6**, 260, doi:10.3389/fimmu.2015.00260 (2015).
- 34 Henning, J. R. *et al.* Dendritic cells limit fibroinflammatory injury in nonalcoholic steatohepatitis in mice. *Hepatology* **58**, 589-602, doi:10.1002/hep.26267 (2013).
- 35 Worbs, T., Hammerschmidt, S. I. & Forster, R. Dendritic cell migration in health and disease. *Nat Rev Immunol* **17**, 30-48, doi:10.1038/nri.2016.116 (2017).
- 36 Kelly, A. *et al.* CD141(+) myeloid dendritic cells are enriched in healthy human liver. *J Hepatol* **60**, 135-142, doi:10.1016/j.jhep.2013.08.007 (2014).
- 37 Doganay, L. *et al.* HLA DQB1 alleles are related with nonalcoholic fatty liver disease. *Mol Biol Rep* **41**, 7937-7943, doi:10.1007/s11033-014-3688-2 (2014).

- 38 Nishimura, S. *et al.* CD8+ effector T cells contribute to macrophage recruitment and adipose tissue inflammation in obesity. *Nat Med* **15**, 914-920 (2009).
- 39 Wieser, V. *et al.* Adipose type I interferon signalling protects against metabolic dysfunction. *Gut* **67**, 157-165, doi:10.1136/gutjnl-2016-313155 (2018).
- 40 Ghazarian, M. *et al.* Type I Interferon Responses Drive Intrahepatic T cells to Promote Metabolic Syndrome. *Sci Immunol* **2**, doi:10.1126/sciimmunol.aai7616 (2017).
- 41 Luo, J. L., Kamata, H. & Karin, M. IKK/NF-kappaB signaling: balancing life and death--a new approach to cancer therapy. *J Clin Invest* **115**, 2625-2632, doi:10.1172/JCI26322 (2005).
- 42 du Plessis, J. *et al.* Association of Adipose Tissue Inflammation With Histologic Severity of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology* **149**, 635-648 e614, doi:10.1053/j.gastro.2015.05.044 (2015).
- 43 Bijnen, M. *et al.* Adipose tissue macrophages induce hepatic neutrophil recruitment and macrophage accumulation in mice. *Gut* **67**, 1317-1327, doi:10.1136/gutjnl-2016-313654 (2018).
- 44 Francque, S. *et al.* PPARalpha gene expression correlates with severity and histological treatment response in patients with non-alcoholic steatohepatitis. *J Hepatol* **63**, 164-173, doi:10.1016/j.jhep.2015.02.019 (2015).
- 45 Matthews, D. R. *et al.* Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* **28**, 412-419 (1985).
- 46 Verrijken, A. *et al.* A gene variant of PNPLA3, but not of APOC3, is associated with histological parameters of NAFLD in an obese population. *Obesity (Silver Spring)* **21**, 2138-2145, doi:10.1002/oby.20366 (2013).
- 47 Kleiner, D. E. *et al.* Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* **41**, 1313-1321, doi:10.1002/hep.20701 (2005).
- 48 Rubtsov, Y. P. *et al.* Regulatory T cell-derived interleukin-10 limits inflammation at environmental interfaces. *Immunity* **28**, 546-558, doi:10.1016/j.immuni.2008.02.017 (2008).
- 49 Pawlak, M. *et al.* The transrepressive activity of Pparalpha is necessary and sufficient to prevent liver fibrosis. *Hepatology*, doi:10.1002/hep.27297 (2014).
- 50 Irizarry, R. A. *et al.* Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics* **4**, 249-264, doi:10.1093/biostatistics/4.2.249 (2003).
- 51 Leek, J. T. & Storey, J. D. Capturing heterogeneity in gene expression studies by surrogate variable analysis. *PLoS Genet* **3**, 1724-1735, doi:10.1371/journal.pgen.0030161 (2007).
- 52 Smyth, G. K., Michaud, J. & Scott, H. S. Use of within-array replicate spots for assessing differential expression in microarray experiments. *Bioinformatics* **21**, 2067-2075, doi:10.1093/bioinformatics/bti270 (2005).
- 53 Goeman, J. J. & Buhlmann, P. Analyzing gene expression data in terms of gene sets: methodological issues. *Bioinformatics* **23**, 980-987, doi:10.1093/bioinformatics/btm051 (2007).

Figure Legends

Figure 1. Identification of hepatic transcriptomic signature of NASH. **a.** WGCNA performed with 11784 transcripts in the liver in patients with or without histologically proven NASH (n=155 patients, see Supplementary Table 1). Clustering of co-expressed genes in 9 gene modules. **b.** Number of transcripts in each gene module. **c.** Overall transcriptional regulation of gene modules upon RYGB (n=21 patients), LSI in responders (n=10 patients), and LSI in non-responders (n=10 patients) at one year follow-up compared to baseline (see Supplementary Table 3 and 4). P-values are calculated by mean-rank gene set test using geneSetTest function as described in detail in methods. **d.** Volcano plots of average \log_2 fold-changes versus P-values (paired moderated t-test using limma package) of all transcripts (gray dots) and transcripts from gene module “blue” (red dots) in RYGB patients (n=21 patients), LSI responders (n=10 patients), and LSI non-responders at one year follow-up compared to baseline. **e.** Top hallmark pathways enriched in gene module “blue” (n=786 transcripts), calculated using GSEA software as described in detail in methods. **f.** Venn diagrams with transcripts in gene module “blue” down-regulated ($P < 0.05$ by moderated paired t-test using limma package) in three groups of patients at follow-up versus baseline, immune-related genes are shown. **g.** Spearman correlations between NASH activity index and hepatic expression levels of genes in gene module “blue” in the 155 patients at baseline, top genes with maximal positive correlation coefficients are shown. **h.** CXCL9, CXCL10, and LYZ expression (by microarray) in NAFL (n=22 patients) and NASH (n=106 patients) patients at baseline. Data are presented as median with 1st and 3rd quartiles as the box edges. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ by unpaired two-sided Mann–Whitney U test.

Figure 2. Correlations between blood immune cell populations, disease activity in NASH, and genes in module “blue”. **a.** Hierarchical clustering of correlation coefficients in 38 patients (see Supplementary Table 5) between proportions of blood immune cell populations and

histological liver parameters (Spearman's correlation), T2D-associated parameters (Pearson correlation) and systemic inflammation markers (Pearson correlation). Asterisks indicate $P < 0.05$ for the given correlation. **b.** Pearson correlations between selected immune cell populations in blood from a subset of 29 patients (see Supplementary Table 5) and hepatic expression levels of genes from module "blue". NAS: NAFLD Activity Score. AI: Activity Index

Figure 3. A diet-induced NASH alters cDC and CD8 T cells and inflammation in the liver. Male C57BL/6J mice were fed conventional diet (CD) or NASH-diet (ND) during 24 weeks (see Supplementary Information). **a.** Representative flow cytometry plots of cDC in the liver: proportions of $XCR1^+$ and $CD172a^+$ of total cDC are shown (n=8 mice CD; n=6 mice ND). **b.** $CD172a^+$ cDC2 cells as proportion of $CD45^+$ cells (n=8 mice CD; n=6 mice ND). **c.** $XCR1^+$ cDC1 cells as proportion of $CD45^+$ cells (n=8 mice CD; n=6 mice ND). **d.** Ratio of cDC1/cDC2 cells (n=8 mice CD; n=6 mice ND). **e.** Representative flow cytometry plots of $TCR\beta^+$ T cells in the liver: proportions of $CD4^+$ and $CD8^+$ of total $TCR\beta^+$ T cells are shown. **f.** Proportion of $CD8^+$ T cells of $CD45^+$ immune cells in the liver (n=9 mice CD; n=20 mice ND). **g.** qPCR analysis of inflammatory gene expression in mouse livers. (n=9 mice CD; n=20 mice ND). Data are shown as mean \pm SEM. Statistical significance of differences between groups are analyzed by unpaired two-sided t-test (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, NS – not significant).

Figure 4. NASH and T2D alter activity of cytotoxic CD8 T cells. **a.** Proportion of $IFN\gamma^+$ and $TNF\alpha^+$ CD8 T lymphocytes in blood from patients with/without NASH and/or T2D (see Supplementary Table 5). Groups: n=7 patients no NASH no T2D, n=6 NASH no T2D, n=7 patients no NASH T2D, n=7 patients NASH T2D. Data are shown as median with 1st and 3rd quartiles. Statistical significance of differences between groups were analyzed by unpaired two-way ANOVA for effects of NASH and T2D followed by Tukey's post-hoc test. **b.** Representative flow cytometric plots and **c.** proportions of perforin, granzyme A and B

expression in blood CD8 T lymphocytes from patients. Groups: n=7 patients no NASH no T2D, n=6 NASH no T2D, n=7 patients no NASH T2D, n=7 patients NASH T2D.. Data are shown as median with 1st and 3rd quartiles. Statistical significance of differences between groups were analyzed by moderated paired t-test or two-way ANOVA (for effects of NASH and T2D) followed by Tukey's *post-hoc* test.

Figure 5. Hepatic CD8 T lymphocytes correlate with lobular inflammation, ballooning, and transcriptomic signature of NASH. **a.** Representative immunostaining for CD8 (red) with haematoxylin counterstaining on liver biopsies from patients with/without NASH and/or T2D. **b.** Quantification of CD8-positive cells per mm². No-NASH No-T2D n = 10, NASH No-T2D n = 10, No-NASH T2D n = 7, NASH T2D n = 9. Data are shown as median with 1st and 3rd quartiles. **c.** Localization of CD8 T lymphocytes (red) near immune infiltrates, steatosis, and ballooned hepatocytes (indicated by arrows) in the liver from NASH patient. Scale bar is 50µm. **d.** Correlations between hepatic CD8 T lymphocyte number and histological features in the liver (n=36). **e.** Pearson correlations and $-\log_{10}$ P-values between hepatic CD8 T lymphocyte and expression levels of gene from module "blue" (n=29, Supplementary Table 5). Statistical significance of differences between groups were analysed by unpaired two-way ANOVA (for effects of NASH and T2D) followed by Tukey's *post-hoc* test (*P < 0.05).

Figure 1

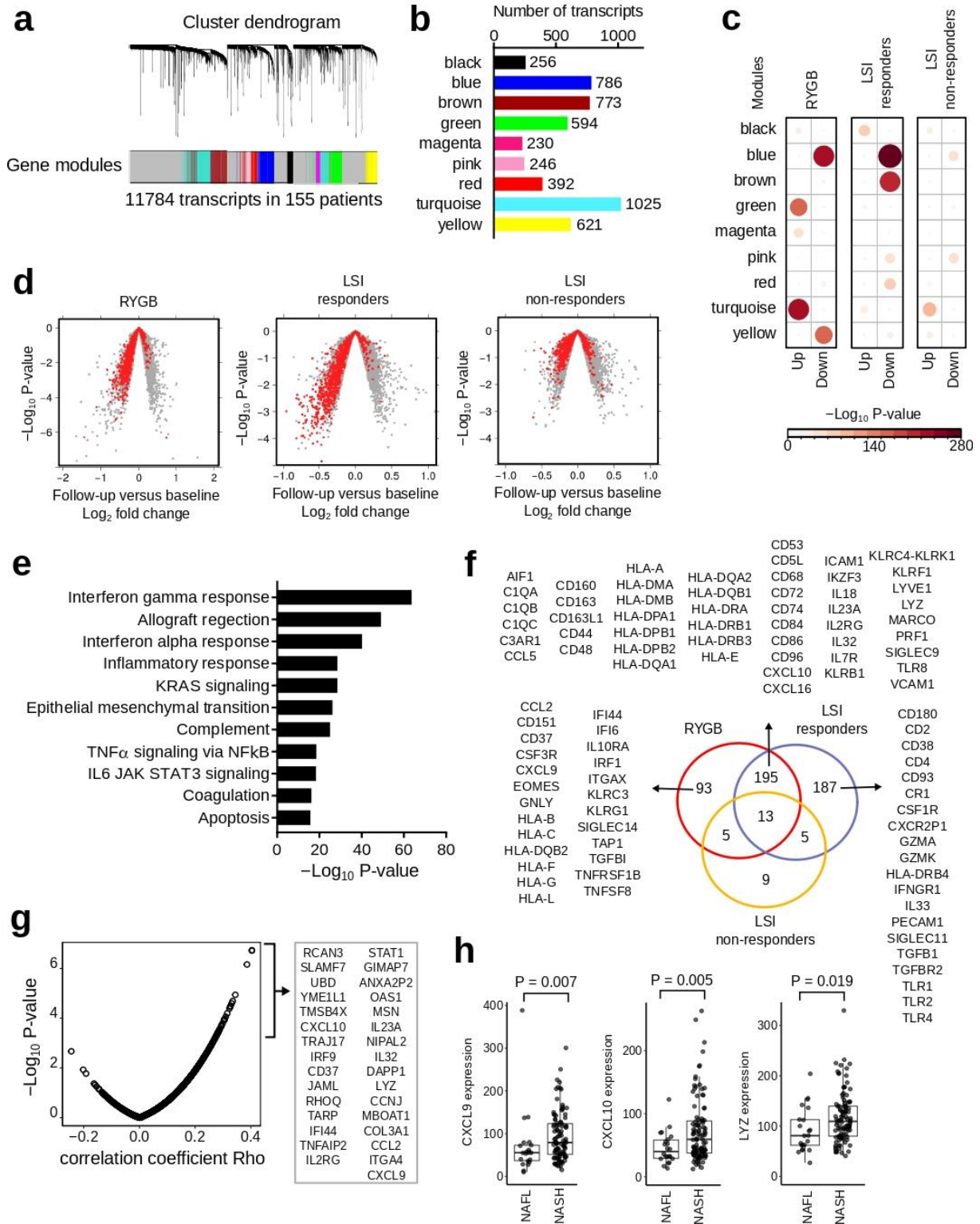


Figure 2

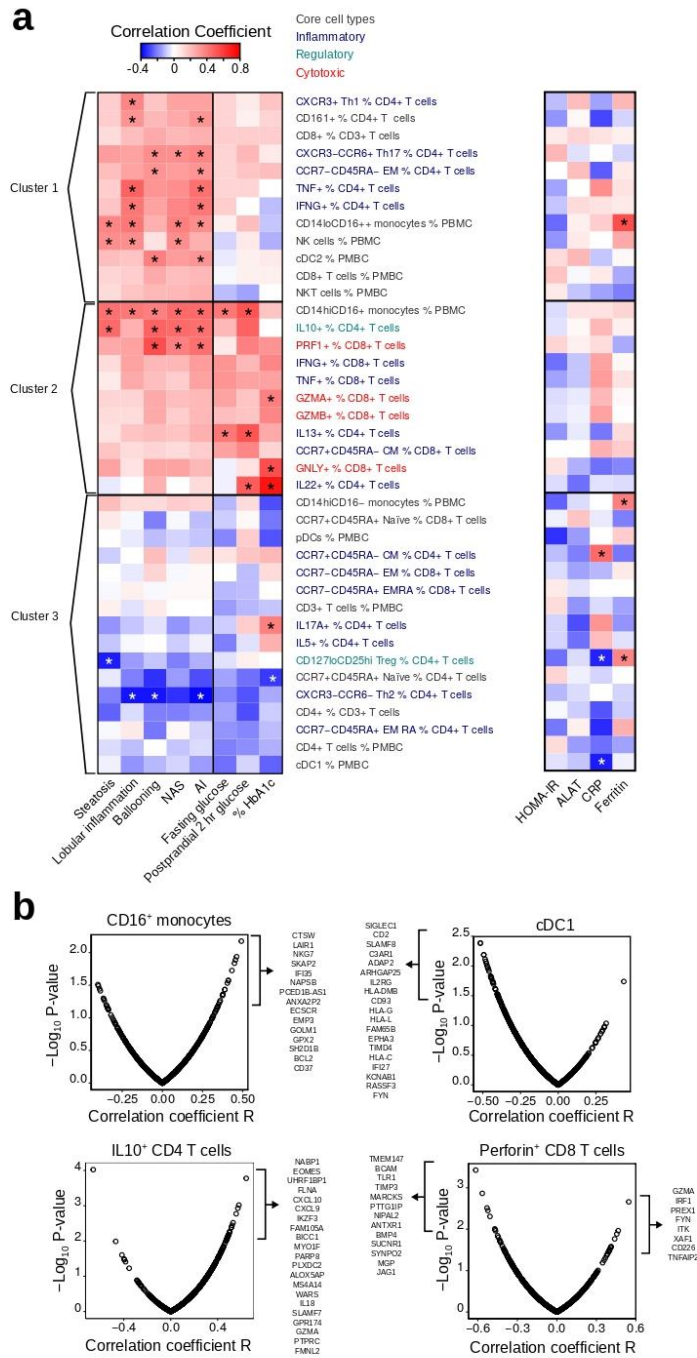


Figure 3

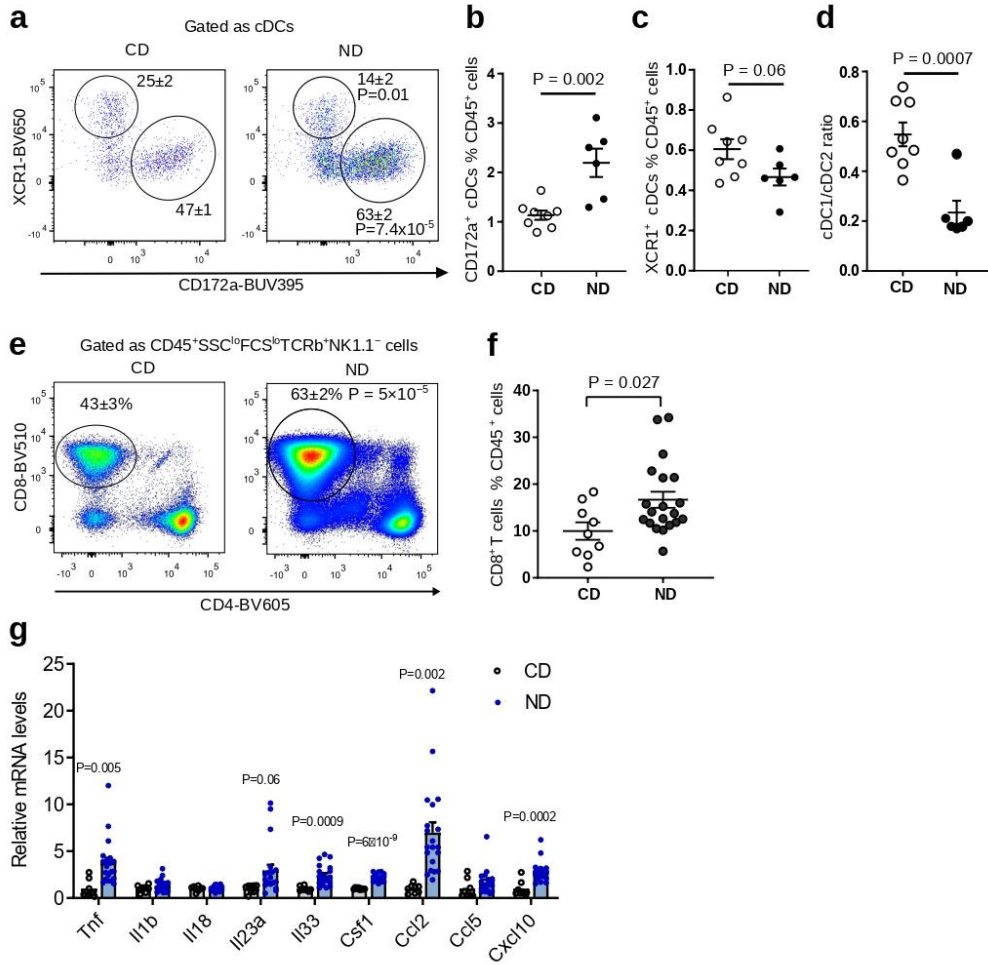


Figure 4

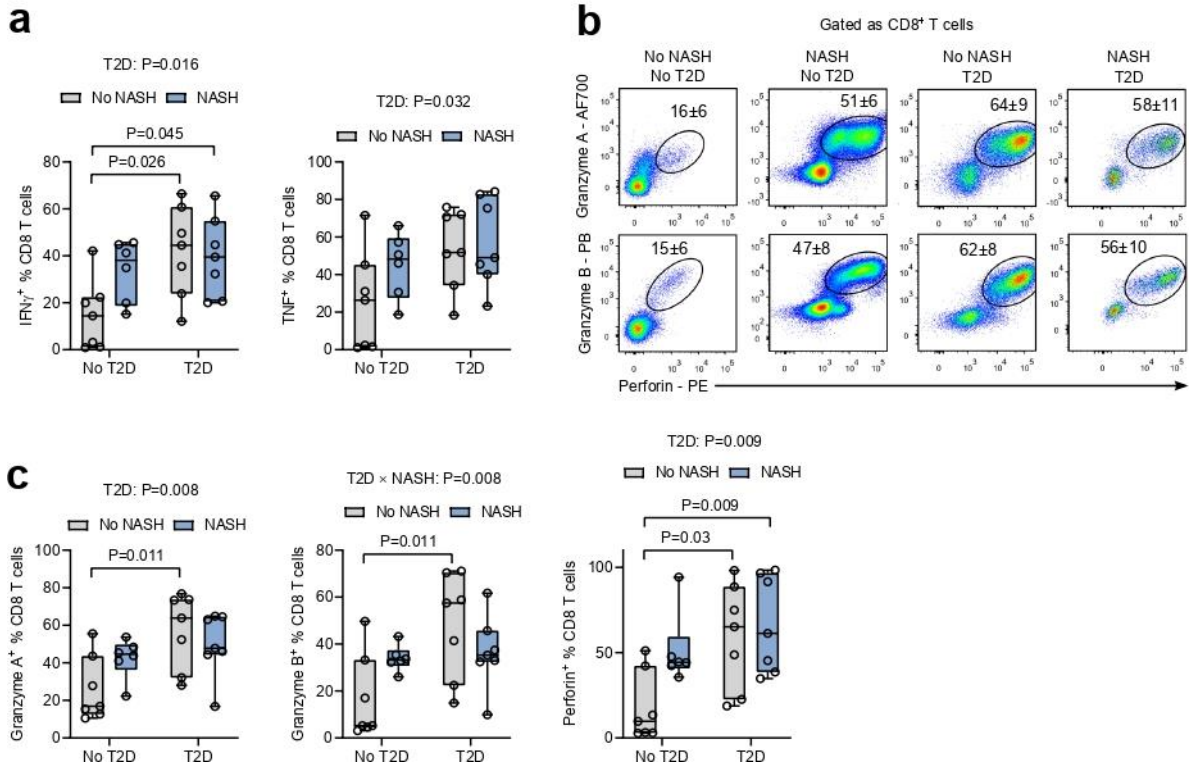
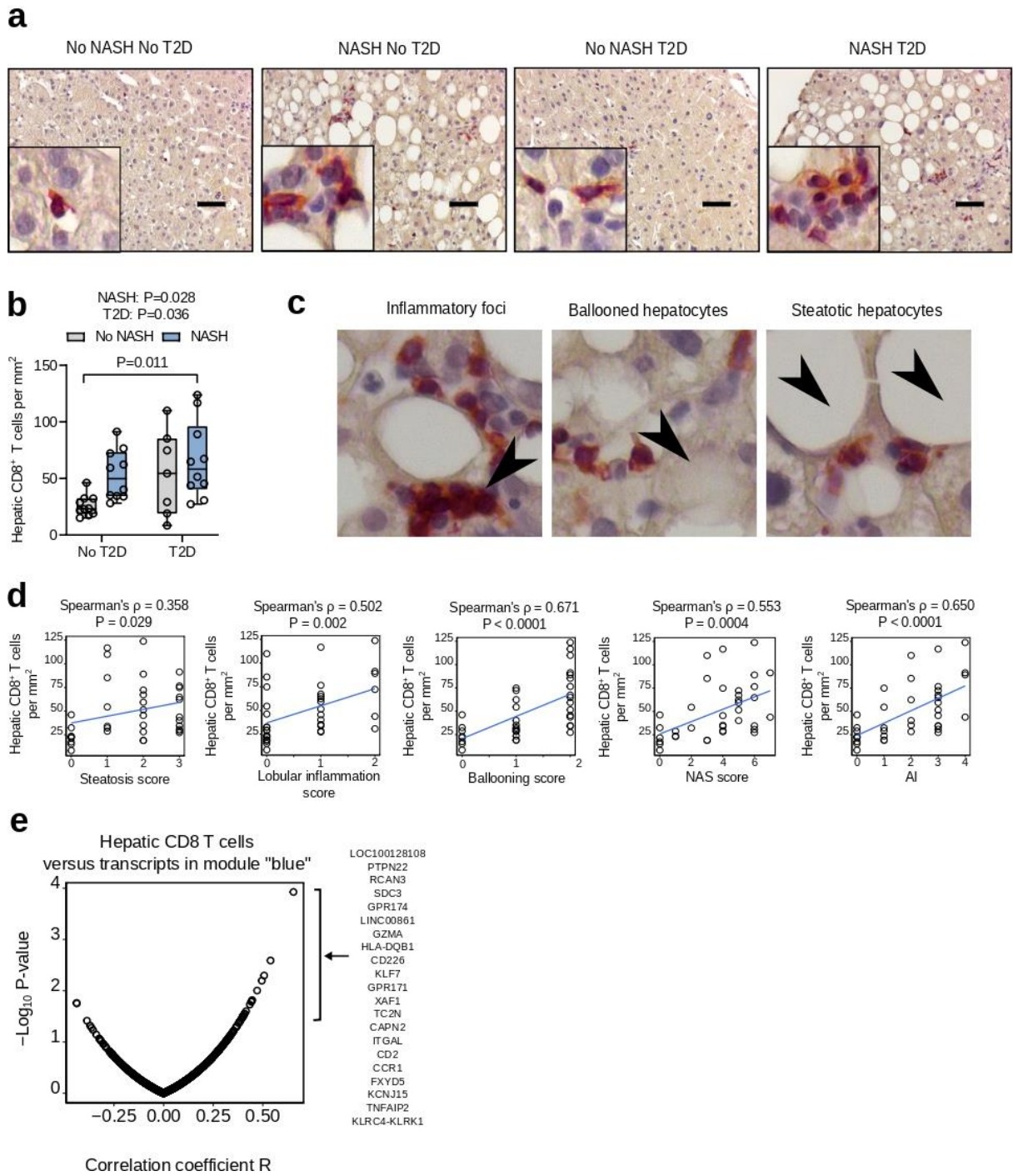


Figure 5



Annexe 3 : Article soumis dans *Hepatology*.

Apolipoprotein F Is Reduced in Humans with Steatosis and Controls Plasma Triglyceride-Rich Lipoprotein Metabolism

Audrey Deprince¹, Nathalie Hennuyer¹, Sander Kooijman², Amanda C M Pronk², Eric Baugé¹, An Verrijken³, Eloïse Woitrain¹, Niels J Kloosterhuis⁴, Eléonore Marez¹, Viktor Lienard¹, Justina C. Wolters⁴, Fanny Lalloyer¹, Delphine Eberlé¹, Sandrine Quemener¹, Emmanuelle Vallez¹, Anne Tailleux¹, Mostafa Kouach⁵, Jean-Francois Goossens⁵, Violeta Raverdy⁶, Bruno Derudas¹, Jan Albert Kuivenhoven⁴, Mickaël Croyal⁷, William R. Lagor⁸, Bart van de Sluis⁴, Sven Francque⁹, François Pattou⁶, Patrick C N Rensen², Bart Staels*¹, Joel T. Haas*¹

Affiliations:

1. Univ. Lille, Inserm, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, U1011- EGID, F-59000 Lille, France
2. Department of Medicine, Division of Endocrinology and Einthoven Laboratory for Experimental Vascular Medicine, Leiden University Medical Center, Leiden, The Netherlands.
3. Department of Endocrinology, Diabetology and Metabolism, Antwerp University Hospital, 2650 Antwerp, Belgium.
4. Department of Paediatrics, University Medical Center Groningen, University of Groningen, Groningen, The Netherlands.
5. Univ. Lille, CHU Lille, EA 7365-GRITA-Groupe de Recherche sur les formes Injectables et les Technologies Associées, F-59000 Lille, France.
6. Univ. Lille, Inserm, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, U1190 - EGID, F-59000, Lille, France.
7. NUN, INRA, CHU Nantes, UMR 1280, PhAN, IMAD, CRNH-O, Nantes, France.
8. Department of Molecular Physiology and Biophysics, Baylor College of Medicine, Houston, TX 77030, USA.
9. Department of Gastroenterology Hepatology, Antwerp University Hospital, Antwerp 2000, Belgium.

* These authors jointly supervised this study

Footnotes Page:

Address for Correspondence:

Joel T. Haas

Institut Pasteur de Lille, 1 rue du Professeur Calmette, BP245, 59019 LILLE - France

Tel: +33 320877171 - Fax: +33 320877360

e-mail: joel.haas@pasteur-lille.fr

Funding Sources:

This work was supported by the Fondation pour la Recherche Médicale (FDT202001010946 to AD), the FP7 “RESOLVE” (Grant ID: 305707 to JTH, BS, AV, SF), the European Genomic Institute for Diabetes (EGID, ANR-10-LABX-0046 to FP and BS), the Agence Nationale de la Recherche PreciNASH (ANR-16-RHUS-0006 to FP and BS) and DeCodeNASH (ANR-20-CE14-0034 to JTH) projects. AD was supported by a PhD fellowship from Ministère de l’Education Nationale et de la Technologie (France). JTH was supported by an EMBO Long Term Fellowship (ALTF277-2014). 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) and by the European Commission: HEPADIP (Contract LSHM-CT-2005-018734). The work is supported by the Netherlands CardioVascular Research Initiative: ‘the Dutch Heart Foundation, Dutch Federation of University Medical Centers, the Netherlands Organization for Health Research and Development and the Royal Netherlands Academy of Sciences’ [CVON2017-2020; Acronym Genius2 to J.A.K.]. J.A.K. is Established Investigator of the Netherlands Heart Foundation [2015T068].

NON-STANDARD ABBREVIATIONS AND ACRONYMS

AAV	Adeno-associated virus
ABOS	Biological Atlas of Severe Obesity
ACLY	ATP Citrate Lyase
Ad	Adenovirus
ALAT	Alanine aminotransferase
ANOVA	Analysis of variance
ApoF	Apolipoprotein F
ASAT	Aspartate aminotransferase
BAT	Brown adipose tissue
CETP	Cholesteryl ester transfer protein
CO	Cholesteryl oleate
CVD	Cardiovascular diseases
Dil	1,10-dioctadecyl-3,3,30,30-tetramethylindocarbocyanine perchlorate

FABP4	Fatty acid binding protein 4
FCR	Fractional catabolic rate
FDR	False discovery rate
FFA	Free fatty acid
GGT	Gamma-glutamyltranspeptidase
hApoF	human ApoF
HDL	High-density lipoprotein
HFSC	High-fat, sucrose + cholesterol
HL	Hepatic lipase
HMGCR	3-hydroxy-3-methylglutaryl-coa reductase
HSPG	Heparan sulfate proteoglycans
IDOL	Inducible degrader of the LDLR
IHH	Immortalized Human Hepatocytes
LDL	Low-density lipoprotein
LDLR	LDL receptor
LPL	Lipoprotein lipase
LRP1	LDL receptor-related protein 1
LSR	Lipolysis stimulated lipoprotein receptor
NES	Normalized enrichment score
P407	Poloxamer 407
PCSK9	Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9
PLIN1	Perilipin 1
PNPLA3	Patatin like phospholipase domain containing 3
SREBP2	Sterol regulatory element-binding protein 2
STAT2	Signal transducer and activator of transcription 2
SULF2	Sulfatase 2
TG	Triglyceride
TGSR	Triglyceride secretion rate
TM6SF2	Transmembrane 6 superfamily member 2
TO	Triolein; glycerol trioleate
TRL	Triglyceride-rich lipoprotein
VLDL	Very low-density lipoprotein
WAT	White adipose tissue

Disclosure : All authors have no conflicts of interest to declare.

ABSTRACT

Background: Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) affects nearly 25% of the global population. Cardiovascular disease (CVD) is the most common cause of death among patients with NAFLD, in line with highly prevalent dyslipidemia in this population. Increased plasma triglyceride (TG)-rich lipoprotein (TRL) concentrations, an important risk factor for CVD, are closely linked with hepatic TG content. Therefore, it is of great interest to identify regulatory mechanisms of hepatic TRL production and remnant uptake in the setting of hepatic steatosis.

Approach and results: To identify liver-regulated pathways linking intra-hepatic and plasma TG metabolism, we performed transcriptomic analysis of liver biopsies from two independent cohorts of obese patients. Hepatic APOF (encoding apolipoprotein F) expression showed the 4th strongest negatively correlation with hepatic steatosis and the strongest negative correlation with plasma TG levels. The effects of adenoviral-mediated human ApoF (hApoF) overexpression on plasma and hepatic TG were assessed in C57BL6/J mice. hApoF overexpression reduced plasma TG levels by ~25% through simultaneous promotion of VLDL secretion and hepatic lipoprotein remnant clearance. Conversely, reducing endogenous ApoF expression reduced VLDL secretion in vivo, and reduced hepatocyte VLDL and LDL uptake by ~15% in vitro. Transcriptomic analysis of APOF-overexpressing mouse livers revealed activation of the SREBP2 pathway, which could contribute to the enhanced ApoB-lipoprotein clearance.

Conclusion: These data reveal a previously undescribed role for ApoF in the control of plasma and hepatic lipoprotein metabolism by favoring hepatic VLDL-TG secretion and hepatic clearance of lipoprotein remnant particles.

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is a major global health challenge, affecting almost 25% of the global population(1). Importantly, cardiovascular disease (CVD) is the most common cause of death among patients with NAFLD, in line with highly prevalent dyslipidemia in this population. Increased plasma triglyceride (TG)-rich lipoprotein (TRL) concentrations, an important risk factor for CVD (2), are closely linked with hepatic TG content (3,4). Given this strong association, it is of great interest to identify regulatory mechanisms of hepatic TG production and remnant uptake in the setting of hepatic steatosis. Hepatic TG accumulation in insulin resistant individuals is attributed to a combination of increased free fatty acid (FFA) flux from adipose tissue to the liver (5) and increased hepatic lipogenesis (6,7). Importantly, these fluxes can be partially counterbalanced by enhanced hepatic TG output (4). Several studies in obese subjects showed that intrahepatic TG content directly correlates with hepatic very low density lipoprotein (VLDL)-TG secretion in subjects

with moderate steatosis (4,8). This effect is likely mediated by increased production of large TG-rich VLDL particles, as is observed in diabetic subjects with hypertriglyceridemia (9). Furthermore, hepatic TG secretion is impaired in subjects with genetic variants associated with increased risk for steatosis, e.g. PNPLA3 rs738409 I148M(10) and especially TM6SF2 rs58542926 E167K(11), highlighting this important mechanism for adaptation to hepatic steatosis.

Overproduction of hepatic VLDL, in combination with decreased TRL-catabolism, exacerbates plasma hypertriglyceridemia. In the circulation, TRLs are metabolized by lipoprotein lipase (LPL) whose activity is regulated by several apolipoproteins (e.g. ApoC's, ApoA-V, ApoE) and the angiopoietin-like system(12). For instance, circulating ApoC-III inhibits LPL, thereby reducing intravascular lipolysis, and its concentrations tightly associate with plasma TG levels in humans(13). Furthermore, subjects with hepatic steatosis and insulin resistance display increased ApoC-III concentrations(14). After LPL-mediated TG hydrolysis, lipoprotein remnants are removed through receptor-mediated pathways, primarily by the liver. Obesity and insulin resistance may also contribute to reductions in remnant clearance by reducing activity of the LDL receptor (LDLR) and LDLR-related protein 1 (LRP1) (among others(15)). Accumulation of LDL as a result of reduced receptor-mediated uptake may also directly inhibit LPL (16), creating a feed-forward loop driving hypertriglyceridemia.

Here, we identify apolipoprotein F (ApoF), also called Lipid Transfer Inhibitor Protein, whose mRNA levels are strongly inversely correlated with hepatic steatosis and plasma TG levels in two independent cohorts of obese patients. ApoF is a 29 kDa protein synthesized and secreted exclusively by the liver(17,18). In circulation, ApoF associates with HDL and, to a lesser extent, LDL particles (19,20). A recent study found that plasma ApoF levels correlated with Originally, ApoF was reported to be an inhibitor of cholesteryl ester transfer protein (CETP), a protein that facilitates exchange of TG for cholesteryl esters between different lipoproteins (20,21). However, there is strong evidence for CETP-independent functions in mice (19).

To determine a potential role for ApoF in the regulation of TG metabolism, we investigated the effects of acute human ApoF overexpression on plasma and hepatic TG in C57BL6/J mice. We found that APOF overexpression simultaneously promoted VLDL secretion, plasma TG clearance and subsequent hepatic remnant lipoprotein clearance. Conversely, Apof knockdown in vivo reduced VLDL secretion and reduced hepatocyte VLDL and LDL uptake. Transcriptomic analysis of APOF-overexpressing mouse livers revealed an activated Sterol Response Element Binding Protein (SREBP)2 pathway, which could contribute to

enhanced ApoB-mediated lipoprotein clearance. These data reveal a novel role for ApoF in the control of plasma and hepatic lipoprotein metabolism.

MATERIALS AND METHODS

Detailed methods are provided as supplementary material.

Human Subjects

ABOS Cohort: Transcriptomic analysis was performed on peri-operative liver biopsies from severely obese (BMI > 35 kg/m²) subjects as part of the ABOS cohort (approval number NCT01129297) as described in our previous study(22).

UZA Cohort: Transcriptomic analysis was performed on percutaneous, transjugular or peri-operative liver biopsies from subjects with overweight (BMI of ≥25 to <30 kg/m²) or obesity (BMI of ≥30 kg/m²) as part of the HEPADIP cohort (Belgian registration number B30020071389, Antwerp University Hospital File 6/25/125) as described previously(23).

Written informed consent was obtained from all patients in both cohorts and the studies were conducted in conformity with the Helsinki Declaration.

Animal experiments

Male wild-type C57BL6/J mice (8-10 weeks; Charles River Laboratories, France) were studied. Animals were maintained in specific pathogen-free conditions (12h/12h light/dark cycle, 21-24°C) and fed normal chow diet (A04, SAFE Diets). To induce obesity and steatosis, mice were fed a high-fat diet enriched in sucrose and cholesterol (HFSC diet) described previously(24) for 4 or 8 weeks. All experimental procedures were approved by the Hauts-de-France Regional Ethical committee (APAFIS# 5746-2016040109244171v2 and APAFIS# 32184-2021062915403703v2).

Statistical analyses

Statistical analysis was performed using GraphPad Prism (GraphPad, San Diego, CA) and R (R-project.org). Statistically significant differences between two groups were assessed by unpaired Student's t-test. Differences between 3 or more groups were assessed by one-way or two-way analysis of variance (ANOVA) followed by Fisher's post hoc test as indicated in the figure legends. Statistical significance was considered for P-values below 0.05 (indicated by *). All bar graphs show means ± SEM.

RESULTS

ApoF correlates inversely with hepatic steatosis and plasma triglycerides in humans

To identify genes whose expression changes with hepatic steatosis, we performed correlation analysis of hepatic transcriptomic data from a cohort of subjects with overweight or obesity (22). Interestingly, the APOF transcript, a liver-specific gene (17), was the fourth-strongest negatively correlated transcript with hepatic steatosis across the transcriptome (Supplemental Table 2). In addition, several genes with known roles in lipid metabolism were among the top 100 transcripts correlated with hepatic steatosis (e.g. VLDL secretion, SULF2 (25); lipid binding and trafficking, FABP4 (26); triglyceride storage, PLIN1 (27); lipogenesis, ACLY (28); Supplemental Table 2). Hepatic APOF transcript levels decreased by ~40% between grade 0 and grade 3 steatosis (Figure 1A). Negative correlations of hepatic APOF expression with hepatic steatosis and plasma TG levels were confirmed in a second, independent cohort (23) (Supplemental Figure 1).

We next investigated associations between hepatic APOF expression and clinical parameters. In addition to correlating negatively with the degree of steatosis, hepatic APOF expression also highly negatively correlated with markers of liver injury such as ASAT, ALAT and GGT (Supplemental Table 3). In univariate analysis, hepatic APOF expression correlated negatively with clinical parameters indicative of severity of cardiometabolic disease (i.e. body weight, fasting glycemia and insulinemia, plasma lipid measures). APOF was the strongest negatively correlated transcript with plasma TG levels (Figure 1B, Supplemental Table 4). It also correlated negatively with plasma non-HDL-C (Figure 1C), an estimation of circulating levels of atherogenic ApoB-containing lipoproteins (29), and positively with plasma HDL-C (Figure 1D). For each 10% decrease in APOF expression, an approximately 10 mg/dL increase in plasma TG was observed (Figure 1B). Collectively, these results shows that low hepatic APOF expression is associated with increased hepatic steatosis and presence of an atherogenic lipoprotein profile (i.e. elevated plasma TG and non-HDL-C and reduced HDL-C levels). These findings suggest that ApoF could regulate plasma and/or hepatic lipoprotein metabolism in humans.

ApoF expression is reduced in livers from mice with steatosis

To determine if a similar relation between hepatic steatosis and ApoF expression is present in mice, male C57BL6/J mice were fed normal chow or a high-fat diet enriched in sucrose and cholesterol (HFSC) diet (24) for 4 or 8 weeks. Liver histology revealed modest hepatic steatosis without evidence of hepatic inflammation after 4 and 8 weeks on the diet. In line, direct biochemical measurement revealed 2- and 4-fold increases in hepatic TG content in HFSC-fed mice at 4 and 8 weeks, respectively (Figure 2A-B). Similar to results observed in humans, hepatic ApoF expression was decreased by 15% after 4 weeks and 25% after 8 weeks of HFSC diet (Figure 2C). Moreover, hepatic ApoF mRNA expression and TG content

were inversely correlated ($R^2 = 0.512$, $p = 0.002$, Figure 2D). These results indicate that hepatic ApoF expression is also reduced in steatotic livers in mice.

Human APOF overexpression in mouse liver decreases plasma triglycerides

To assess whether ApoF directly regulates plasma TRL metabolism, the effects of acute, liver-specific adenoviral overexpression of human ApoF (Ad-hApoF) in mice were investigated. APOF mRNA expression was detected in livers of Ad-hApoF mice 4 days after infection (Figure 3A), increasing total (combined murine and human) ApoF expression by 1.5- to 2-fold compared to GFP-adenovirus injected (Ad-GFP) controls. Moreover, human ApoF (hApoF) protein was detectable in plasma from Ad-hApoF, but not Ad-GFP mice (7 representative mice from each group, Figure 3B). Unfortunately, detection of murine ApoF in plasma was not possible due to the lack of commercially available specific antibodies. Plasma TG and cholesterol were measured after a 5-hour fast to exclude chylomicrons. Interestingly, plasma TG levels decreased by 30% (Figure 3D), while plasma total cholesterol levels were unchanged by hApoF overexpression (Figure 3C). Plasma lipoprotein lipid profile analysis by fast-protein liquid chromatography (FPLC) revealed a similar total cholesterol distribution across the different lipoprotein fractions in Ad-hApoF and Ad-GFP mice (Figure 3E), whereas TG were approximately 50% lower in the VLDL fraction of mice overexpressing hApoF (Figure 3F). In line, plasma protein concentrations of the HDL-apolipoprotein ApoA-I and ApoA-II were unchanged (Figure 3G and 3H), whereas total ApoB levels were decreased ~15% ($p < 0.05$, Figure 3I).

In fasted conditions, steady-state plasma TG levels are determined by the balance between hepatic VLDL-TG output and TG clearance by intravascular TG lipolysis and receptor-mediated remnant clearance(30). To determine how APOF overexpression affects this equilibrium, hepatic VLDL-TG output was measured following LPL inhibition by Poloxamer 407 (P407) injection in Ad-hApoF and Ad-GFP infected mice, as described in the supplemental methods. Despite significantly reduced baseline fasting TG levels in Ad-hApoF mice (108 mg/dL in Ad-GFP vs 75 mg/dL in Ad-hApoF mice, $p < 0.05$, Figure 3D and 3J), plasma TG levels were higher in Ad-hApoF than Ad-GFP mice at both 120 and 180 min after P407 injection (Figure 3J), indicating increased hepatic VLDL-TG output in Ad-hApoF mice. Calculation of hepatic TG production and fractional catabolic rate (FCR) revealed that both VLDL-TG production and catabolism were increased in Ad-hApoF mice (Figure 3K and 3L).

To test the impact of decreasing ApoF expression on plasma lipoprotein metabolism, endogenous ApoF expression was reduced using adenovirus-mediated ApoF shRNA (Ad-shApoF). Hepatic ApoF mRNA expression was reduced by 30% at 4 days post-injection (Figure 4A). Total plasma TG was similar in Ad-shApoF compared to Ad-shLacZ-injected

controls, though VLDL-TG tended to increase (27%) (Figure 4B and 4D). As with hApoF overexpression, no change in plasma total cholesterol nor individual lipoprotein fraction cholesterol levels was observed (Figure 4C and 4E). Despite the unchanged steady-state plasma lipid levels upon partial ApoF knockdown, a significant decrease in hepatic VLDL-TG production was observed in the Ad-shApoF mice (Figure 4F and 4G). Moreover, VLDL FCR also tended to decrease (17%, $p = 0.15$, Figure 4H), suggesting a concomitant reduction in plasma TG catabolism in Ad-shApoF mice. Together, results from hepatic overexpression and knockdown experiments suggest that ApoF simultaneously affects VLDL-TG secretion and clearance to achieve a net reduction in fasting plasma TG levels.

hApoF favors remnant particle clearance by the liver

Enhanced catabolism of circulating TG can be due to either increased intravascular lipolysis and/or receptor-mediated endocytosis of TRLs and their remnants. To assess the relative contributions of each process, we next measured post-prandial TG excursion levels following an oil bolus in Ad-hApoF and control Ad-GFP mice. In line with increased FCR in Ad-hApoF mice (Figure 3L), a strong reduction in both peak TG levels (T=2 hours) and area under the curve was observed (Figure 5A). This suggests that hApoF overexpression accelerates plasma TG clearance.

We next examined whether ApoF overexpression impacts the activities of lipoprotein lipase (LPL) and hepatic lipase (HL), the two enzymes catalyzing the majority of intravascular TG hydrolysis (31). Post-heparin plasma LPL and HL activities were not affected by hApoF overexpression (Figure 5B). Moreover, plasma levels of ApoC-III, a strong inhibitor of LPL activity(32), were similar in Ad-hApoF and Ad-GFP-injected mice (Figure 5C). As expected, plasma ApoC-III correlated strongly with plasma TGs across both groups (Figure 5D). Finally, plasma concentrations of ApoE, a ligand for receptor-mediated remnant uptake(33), were also unchanged, whereas the ratio ApoC-III/ApoE tended to decrease in Ad-hApoF mice (Figure 5E and 5F). Collectively, these results suggest that ApoF does not directly modulate post-heparin LPL and HL activity, nor does it impact plasma ApoC3 levels.

To directly assess whether ApoF affects TG lipolysis and VLDL remnant uptake in vivo, a dual-label (glycerol tri[3H]oleate (TO) and [14C]cholesteryl oleate (CO)) tracer experiment of VLDL-like particles(34) was performed in Ad-hApoF and Ad-GFP animals. The plasma decay and uptake of [3H]TO, primarily reflecting the hydrolysis of [3H]TO and uptake of 3H-oleate by the different tissues, was similar in both groups (Figure 5G). As observed previously (34), sub-clavicular and intrascapular brown adipose tissue depots showed the highest lipolytic activity (Figure 5H). Interestingly, plasma decay of [14C]CO, reflecting receptor-mediated clearance of remnant particles, was significantly faster in Ad-hApoF compared to Ad-GFP

mice (Figure 5I). Consistent with its dominant role in the clearance of lipoprotein remnants, the liver showed the highest amount of [¹⁴C]CO uptake in both groups, with a 30% increase ($p < 0.05$) in Ad-hApoF mice (Figure 5J). These results suggest that hApoF overexpression reduces plasma TG levels via enhanced VLDL remnant uptake by the liver.

Downregulation of ApoF reduces hepatocyte Dil-VLDL and Dil-LDL uptake

Because APOF expression is highly liver specific, we next tested whether altering ApoF expression in cultured hepatocytes affects remnant uptake in a cell-autonomous manner. For this, immortalized human hepatocytes (IHH) were transfected with small interfering RNAs (siRNAs) targeting ApoF (siApoF) or non-targeting control siRNAs (Figure 6A and 6C) and subsequently incubated with fluorescent Dil-labeled VLDL or LDL particles. Consequently, particle uptake activity is directly proportional to the intracellular Dil fluorescence after incubation (35). Interestingly, siApoF transfected cells displayed similar ~20% reductions in both Dil-VLDL (Figure 6B) and Dil-LDL (Figure 6D) uptake. These results indicate that downregulation of ApoF expression in hepatocytes lowers VLDL and LDL uptake, and suggests that ApoF functions in a cell-autonomous manner to enhance lipoprotein particle clearance.

hApoF overexpression activates the SREBP2 pathway

Our in vitro results suggest that ApoF modulates remnant clearance through a direct effect in hepatocytes. To identify pathways regulated by APOF overexpression, transcriptomic profiling of livers from Ad-hApoF and Ad-GFP mice was performed. Gene set enrichment analysis revealed that genes involved in cholesterol biosynthesis, metabolism and lipid and lipoprotein metabolism were most strongly affected by hepatic APOF overexpression (Supplemental Table 5). Among upregulated genes are those involved in ApoB-lipoprotein uptake, such as the Ldlr, its two key post-transcriptional regulators, Mylip (encoding Idol) and Pcsk9, as well as two other lipoprotein receptors, Lrp1 and Lsr (Figure 7A). Interestingly, many of these genes are transcriptionally activated by SREBP2, whose activity is induced upon intracellular cholesterol depletion such as after statin treatment (36). Our group has previously described a hepatic transcriptome signature of statin treatment in the same ABOS cohort studied to identify APOF(22). To test whether a similar gene signature occurs in mice upon APOF overexpression, we designed a gene set of the top 100 genes upregulated by statin treatment in humans (corresponding to a false discovery rate < 0.005) and compared it to the gene expression profile in ApoF overexpressing livers. Strikingly, Ad-hApoF livers displayed a strong enrichment of the statin-regulated gene signature (NES = 2.52, $p \approx 4.6 \times 10^{-9}$, Figure 7B). Collectively, these data suggest that hApoF overexpression enhances remnant clearance through activation of the SREBP2 pathway in hepatocytes.

DISCUSSION

In the present study, we identified APOF as a liver-specific transcript strongly inversely associated with hepatic TG levels in two cohorts of obese patients. Decreased hepatic APOF expression was also associated with an atherogenic plasma lipid profile (increased plasma TG and non-HDL-C and decreased HDL-C) in this cohort. Further mechanistic investigations in mice revealed a direct role for ApoF in the control of plasma TG levels. Indeed, our results indicate that hApoF overexpression results in simultaneous increases in hepatic VLDL-TG output and clearance of TRL-derived remnant particles. This mostly likely occurred through a liver-autonomous mechanism driven by activation of the SREBP2 pathway. Our study thus identified a novel role of ApoF in TRL production and clearance.

In the present study, we found that acute hApoF overexpression reduced plasma TG levels likely through enhanced receptor-mediated remnant clearance. We did not observe reduced plasma total and HDL cholesterol levels as described by Lagor et al.(19), which could be explained by methodological differences between these studies. Namely, acute (present study) vs chronic overexpression and the relative level of overexpression; roughly 2-fold (present study) vs ~25-fold in the study of Lagor et al. Furthermore, the markedly longer half-life of HDL (~24 hours) than that of VLDL (~10-15 minutes) could also explain the absence of an effect on plasma cholesterol levels in our setting (only 72 hours after induction of ApoF expression). Further studies could address dose- or time-dependent effects of changes in ApoF expression on plasma lipoprotein kinetics. Finally, an ApoF-deficient mouse model was previously reported to display reduced plasma TG levels(17), though these mice were later shown to display hypomorphic expression of the two adjacent genes to the ApoF locus, Stat2 and Apon(37). Consequently, it is unclear how much of the lipid phenotype of those mice could be directly ascribed to ApoF-deficiency.

We observed that hepatic ApoF mRNA levels correlate with hepatic steatosis and plasma lipids in obese patients. These data are consistent with the results of two independent clinical studies which found that plasma ApoF protein concentrations correlate negatively with plasma TG and positively with HDL-C in humans(38,39). More recently, plasma ApoF concentrations were shown to correlate with a polygenic risk score for T2D development (40). Though not specifically assessed in that study, it is tempting to speculate that reduced plasma ApoF may similarly associate with NAFLD risk, considering the strong link between T2D and NAFLD. Moreover, our results suggest that elevated hepatic APOF expression could improve the lipoprotein profile and lower cardiovascular risk(41,42).

Our data support a role of ApoF in hepatic remnant uptake. Chylomicron and VLDL remnants, as well as LDL particles, are taken up in the liver via different receptors of the

LDLR receptor family. Simultaneous genetic invalidation of LDLR, LRP1 and HSPGs in mice has shown that these receptors are responsible for the majority of remnant particle uptake and that other receptors are unable to compensate for their absence(43). The fact that ApoF overexpression increased expression of SREBP2 target genes involved in lipoprotein uptake such as the LDLR, but also PCSK9, its endogenous inhibitor, suggest SREBP-2 pathway activation as a likely contributing mechanism (44).

How ApoF activates the SREBP2 pathway while favoring hepatic particle uptake remains an open question. One possibility is an intracellular effect on cholesterol trafficking. For example, previous work has demonstrated differential effects of chylomicron- versus LDL-derived cholesterol on SREBP2 activation (45). Using isolated hamster hepatocytes, these authors showed chylomicron-derived cholesterol apparently enters the intracellular regulatory pool for SREBP2, while LDL-derived cholesterol is rather directly esterified and re-secreted in VLDL. Because hApoF overexpression increased VLDL secretion, it may modulate intracellular cholesterol trafficking to avoid feedback inhibition on SREBP2. In the context of metabolic syndrome, decreased ApoF levels could favor toxic accumulation of cholesterol in hepatocytes. Though beyond the scope of the present work, future studies could investigate how ApoF impacts homeostasis of the intracellular regulatory pool of cholesterol.

The present study has several limitations. First, we chose to overexpress human ApoF and not the murine isoform in our mouse model. Human and murine ApoF protein sequences are highly similar with 61% amino acid identity and ~75% homology. Lagor et al. showed that overexpression of the human or murine isoform of ApoF led to the same effect on reverse cholesterol transport(19). Consequently, we expect to obtain similar changes in plasma TG levels with murine ApoF overexpression. Second, we showed that post-prandial lipemia was attenuated by hApoF overexpression after an olive oil gavage. However, this setting mostly reflects changes in chylomicron metabolism, which are intestinally derived, and not VLDL(46). ApoF is not expressed by the intestine(17) and adenovirus-mediated overexpression is overwhelmingly liver-restricted. Moreover, chylomicron and VLDL remnants share many similarities in terms of their clearance. Consequently, we attribute the attenuated post-prandial plasma TG excursion to ApoF's actions on hepatic remnant clearance, rather than an indirect effect on intestinal TG uptake and/or production. Since elevated non-fasting TG increase cardiovascular risk (47,48), elevating hepatic ApoF levels may be protective against cardiovascular disease.

Finally, the specific receptor(s) activated by ApoF were not identified in the present study. Indeed, our in vitro model demonstrated that acute ApoF knockdown in hepatocytes was sufficient to reduce Dil-labeled particle uptake. Unfortunately, the complementary over-

expression experiments were not possible due to our inability to overexpress ApoF in IHH cells by standard viral transduction or transfection methods. Still, activation of the SREBP2 pathway in hApoF overexpressing mice strongly implicates the LDLR as a mediator of increased uptake. This result is corroborated by results in hamsters treated with siRNAs against ApoF, which displayed a decrease in hepatic expression of the SREBP2 target genes LDLR and HMGCR (21). Further studies will be necessary to dissect the relative contribution of each receptor to ApoF's effect on remnant particle clearance.

In conclusion, we identify a new function for ApoF in plasma lipoprotein production and clearance and a high level of ApoF could play a protective role in the context of metabolic syndrome against the development of cardiovascular diseases.

Acknowledgments:

The authors would like to thank Emilie Dorchie for technical assistance with animal experiments. We are grateful to the "Biogenouest Corsaire" core facility for its technical support in mass spectrometry experiments.

References:

1. Paik JM, Golabi P, Younossi Y, Mishra A, Younossi ZM. Changes in the Global Burden of Chronic Liver Diseases From 2012 to 2017: The Growing Impact of NAFLD. *Hepatology*. 2020;72:1605–1616.
2. Ginsberg HN, Packard CJ, Chapman MJ, Borén J, Aguilar-Salinas CA, Averna M, et al. Triglyceride-rich lipoproteins and their remnants: metabolic insights, role in atherosclerotic cardiovascular disease, and emerging therapeutic strategies—a consensus statement from the European Atherosclerosis Society. *European Heart Journal* [Internet]. 2021 [cited 2021 Nov 17]; Available from: <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehab551>
3. Adiels M, Olofsson S-O, Taskinen M-R, Borén J. Overproduction of very low-density lipoproteins is the hallmark of the dyslipidemia in the metabolic syndrome. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008;28:1225–1236.
4. Fabbrini E, Mohammed BS, Magkos F, Korenblat KM, Patterson BW, Klein S. Alterations in adipose tissue and hepatic lipid kinetics in obese men and women with nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology*. 2008;134:424–431.
5. Donnelly KL, Smith CI, Schwarzenberg SJ, Jessurun J, Boldt MD, Parks EJ. Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J. Clin. Invest*. 2005;115:1343–1351.

6. Lambert JE, Ramos-Roman MA, Browning JD, Parks EJ. Increased de novo lipogenesis is a distinct characteristic of individuals with nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology*. 2014;146:726–735.
7. Smith GI, Shankaran M, Yoshino M, Schweitzer GG, Chondronikola M, Beals JW, et al. Insulin resistance drives hepatic de novo lipogenesis in nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Invest*. 2020;130:1453–1460.
8. Mittendorfer B, Yoshino M, Patterson BW, Klein S. VLDL Triglyceride Kinetics in Lean, Overweight, and Obese Men and Women. *J Clin Endocrinol Metab*. 2016;101:4151–4160.
9. Adiels M, Borén J, Caslake MJ, Stewart P, Soro A, Westerbacka J, et al. Overproduction of VLDL1 driven by hyperglycemia is a dominant feature of diabetic dyslipidemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25:1697–1703.
10. Romeo S, Kozlitina J, Xing C, Pertsemlidis A, Cox D, Pennacchio LA, et al. Genetic variation in PNPLA3 confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease. *Nat. Genet*. 2008;40:1461–1465.
11. Kozlitina J, Smagris E, Stender S, Nordestgaard BG, Zhou HH, Tybjærg-Hansen A, et al. Exome-wide association study identifies a TM6SF2 variant that confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease. *Nat. Genet*. 2014;46:352–356.
12. Kersten S. Physiological regulation of lipoprotein lipase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*. 2014;1841:919–933.
13. Cohn JS, Patterson BW, Uffelman KD, Davignon J, Steiner G. Rate of production of plasma and very-low-density lipoprotein (VLDL) apolipoprotein C-III is strongly related to the concentration and level of production of VLDL triglyceride in male subjects with different body weights and levels of insulin sensitivity. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004;89:3949–3955.
14. Taskinen M-R, Adiels M, Westerbacka J, Söderlund S, Kahri J, Lundbom N, et al. Dual metabolic defects are required to produce hypertriglyceridemia in obese subjects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2011;31:2144–2150.
15. Deprince A, Haas JT, Staels B. Dysregulated lipid metabolism links NAFLD to cardiovascular disease. *Mol Metab*. 2020;42:101092.
16. Bissonnette S, Salem H, Wassef H, Saint-Pierre N, Tardif A, Baass A, et al. Low density lipoprotein delays clearance of triglyceride-rich lipoprotein by human subcutaneous adipose tissue. *J Lipid Res*. 2013;54:1466–1476.
17. Lagor WR, Fields DW, Khetarpal SA, Kumaravel A, Lin W, Weintraub N, et al. The effects of apolipoprotein F deficiency on high density lipoprotein cholesterol metabolism in mice. *PLoS One*. 2012;7:e31616.

18. Olofsson SO, McConathy WJ, Alaupovic P. Isolation and partial characterization of a new acidic apolipoprotein (apolipoprotein F) from high density lipoproteins of human plasma. *Biochemistry*. 1978;17:1032–1036.
19. Lagor WR, Brown RJ, Toh S-A, Millar JS, Fuki IV, de la Llera-Moya M, et al. Overexpression of apolipoprotein F reduces HDL cholesterol levels in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2009;29:40–46.
20. Morton RE, Greene DJ. Regulation of lipid transfer between lipoproteins by an endogenous plasma protein: selective inhibition among lipoprotein classes. *J Lipid Res*. 1994;35:836–847.
21. Morton RE, Liu Y, Izem L. ApoF knockdown increases cholesteryl ester transfer to LDL and impairs cholesterol clearance in fat-fed hamsters. *J Lipid Res*. 2019;60:1868–1879.
22. Margerie D, Lefebvre P, Raverdy V, Schwahn U, Ruetten H, Larsen P, et al. Hepatic transcriptomic signatures of statin treatment are associated with impaired glucose homeostasis in severely obese patients. *BMC Med Genomics*. 2019;12:80.
23. Lefebvre P, Lalloyer F, Bauge E, Pawlak M, Gheeraert C, Dehondt H, et al. Interspecies NASH disease activity whole-genome profiling identifies a fibrogenic role of PPARalpha-regulated dermatopontin. *JCI Insight*. 2017;2.
24. Haas JT, Vonghia L, Mogilenko DA, Verrijken A, Molendi-Coste O, Fleury S, et al. Transcriptional Network Analysis Implicates Altered Hepatic Immune Function in NASH development and resolution. *Nat Metab*. 2019;1:604–614.
25. Matikainen N, Burza MA, Romeo S, Hakkarainen A, Adiels M, Folkersen L, et al. Genetic variation in SULF2 is associated with postprandial clearance of triglyceride-rich remnant particles and triglyceride levels in healthy subjects. *PLoS One*. 2013;8:e79473.
26. Coilly A, Desterke C, Guettier C, Samuel D, Chiappini F. FABP4 and MMP9 levels identified as predictive factors for poor prognosis in patients with nonalcoholic fatty liver using data mining approaches and gene expression analysis. *Sci Rep*. 2019;9:19785.
27. Pawella LM, Hashani M, Eiteneuer E, Renner M, Bartenschlager R, Schirmacher P, et al. Perilipin discerns chronic from acute hepatocellular steatosis. *J Hepatol*. 2014;60:633–642.
28. Guo L, Guo Y-Y, Li B-Y, Peng W-Q, Chang X-X, Gao X, et al. Enhanced acetylation of ATP-citrate lyase promotes the progression of nonalcoholic fatty liver disease. *J Biol Chem*. 2019;294:11805–11816.
29. Robinson JG. Are You Targeting Non-High-Density Lipoprotein Cholesterol? **Editorials published in the *Journal of the American College of Cardiology* reflect the views of the authors and do

not necessarily represent the views of JACC or the American College of Cardiology. *Journal of the American College of Cardiology*. 2009;55:42–44.

30. Adiels M, Mardinoglu A, Taskinen M-R, Borén J. Kinetic Studies to Elucidate Impaired Metabolism of Triglyceride-rich Lipoproteins in Humans. *Front Physiol*. 2015;6:342.

31. Young SG, Zechner R. Biochemistry and pathophysiology of intravascular and intracellular lipolysis. *Genes Dev*. 2013;27:459–484.

32. Graham MJ, Lee RG, Bell TA, Fu W, Mullick AE, Alexander VJ, et al. Antisense oligonucleotide inhibition of apolipoprotein C-III reduces plasma triglycerides in rodents, nonhuman primates, and humans. *Circ Res*. 2013;112:1479–1490.

33. Mahley RW, Ji ZS. Remnant lipoprotein metabolism: key pathways involving cell-surface heparan sulfate proteoglycans and apolipoprotein E. *J Lipid Res*. 1999;40:1–16.

34. Berbée JFP, Boon MR, Khedoe PPSJ, Bartelt A, Schlein C, Worthmann A, et al. Brown fat activation reduces hypercholesterolaemia and protects from atherosclerosis development. *Nat Commun*. 2015;6:6356.

35. Reynolds GD, St Clair RW. A comparative microscopic and biochemical study of the uptake of fluorescent and 125I-labeled lipoproteins by skin fibroblasts, smooth muscle cells, and peritoneal macrophages in culture. *Am J Pathol*. 1985;121:200–211.

36. Yang H, Zhang M, Long S, Tuo Q, Tian Y, Chen J, et al. Cholesterol in LDL receptor recycling and degradation. *Clinica Chimica Acta*. 2020;500:81–86.

37. Lagor WR, Fields DW, Bauer RC, Crawford A, Abt MC, Artis D, et al. Genetic manipulation of the ApoF/Stat2 locus supports an important role for type I interferon signaling in atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2014;233:234–241.

38. Kujiraoka T, Nakamoto T, Sugimura H, Iwasaki T, Ishihara M, Hoshi T, et al. Clinical significance of plasma apolipoprotein F in Japanese healthy and hypertriglyceridemic subjects. *J Atheroscler Thromb*. 2013;20:380–390.

39. Morton RE, Gnizak HM, Greene DJ, Cho K-H, Paromov VM. Lipid transfer inhibitor protein (apolipoprotein F) concentration in normolipidemic and hyperlipidemic subjects. *J Lipid Res*. 2008;49:127–135.

40. Ritchie SC, Lambert SA, Arnold M, Teo SM, Lim S, Scepanovic P, et al. Integrative analysis of the plasma proteome and polygenic risk of cardiometabolic diseases. *Nat Metab*. 2021;3:1476–1483.

41. Emerging Risk Factors Collaboration, Di Angelantonio E, Sarwar N, Perry P, Kaptoge S, Ray KK, et al. Major lipids, apolipoproteins, and risk of vascular disease. *JAMA*. 2009;302:1993–2000.

42. Nordestgaard BG. Triglyceride-Rich Lipoproteins and Atherosclerotic Cardiovascular Disease: New Insights From Epidemiology, Genetics, and Biology. *Circ Res.* 2016;118:547–563.
43. Foley EM, Gordts PLSM, Stanford KI, Gonzales JC, Lawrence R, Stoddard N, et al. Hepatic remnant lipoprotein clearance by heparan sulfate proteoglycans and low-density lipoprotein receptors depend on dietary conditions in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2013;33:2065–2074.
44. Zhang D-W, Lagace TA, Garuti R, Zhao Z, McDonald M, Horton JD, et al. Binding of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 to epidermal growth factor-like repeat A of low density lipoprotein receptor decreases receptor recycling and increases degradation. *J Biol Chem.* 2007;282:18602–18612.
45. Sniderman AD, Qi Y, Ma C-IJ, Wang RHL, Naples M, Baker C, et al. Hepatic Cholesterol Homeostasis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology.* 2013;33:2481–2490.
46. Ko C-W, Qu J, Black DD, Tso P. Regulation of intestinal lipid metabolism: current concepts and relevance to disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2020;17:169–183.
47. Hirata A, Okamura T, Hirata T, Sugiyama D, Ohkubo T, Okuda N, et al. Relationship between non-fasting triglycerides and cardiovascular disease mortality in a 20-year follow-up study of a Japanese general population: NIPPON DATA90. *J Epidemiol.* 2021;
48. Jørgensen AB, Frikke-Schmidt R, West AS, Grande P, Nordestgaard BG, Tybjaerg-Hansen A. Genetically elevated non-fasting triglycerides and calculated remnant cholesterol as causal risk factors for myocardial infarction. *Eur Heart J.* 2013;34:1826–1833.

Figure_1

Figure 1. Hepatic APOF expression is negatively correlated with steatosis and dyslipidemia in a cohort of obese patients.

(A) Normalized hepatic APOF mRNA expression in relation with stage of steatosis in obese patients. Relationship of plasma TG (B), non-HDL-C (C) and HDL-C (D) with hepatic APOF expression in a cohort of obese patients (n=551; 128 males and 423 women). r, Spearman's correlation coefficient. Data from (A) are shown as the log₂ fold change compared to grade 0 ± SEM.

Figure_2

Figure 2: Apof expression is lower in steatotic livers of obese mice. (A) Histological representation of a hematoxylin-eosin stained liver sections after 4 and 8 weeks of chow or HFSC diet, scale bar: 100 µm. (B) Hepatic TG in mice after 4 and 8 weeks of chow or HFSC diet (n=6-10 per group). (C) Hepatic APOF expression in mice after 4 and 8 weeks of chow or HFSC diet (n=6-10 per group). (D) Linear regression of hepatic Apof expression and

hepatic TG content in HFSC-fed mice for the indicated durations. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ as compared to chow by t-test. All data are shown as the means \pm SEM.

Figure_3

Figure 3. APOF overexpression decreases plasma TG levels and simultaneously favors liver secretion and clearance of TG.

Hepatic APOF mRNA (A) and western blot for plasma human ApoF (B) in Ad-GFP or Ad-hApoF mice (n=8-9 per group). Plasma TC (C) and TG (D) in 5-hour fasted Ad-GFP or Ad-hApoF mice (n=8-9 per group). Fractionated pooled plasma cholesterol (E) and TG (F) by FPLC in 5 hours fasted Ad-GFP or Ad-hApoF mice (pool of 6 mice per group). Plasma ApoA-I (G), ApoA-II (H) and ApoB (I) in 5 hours fasted Ad-GFP or Ad-hApoF mice (n=8 per group). Plasma TG (J) and calculation of TG production (K) and fractional catabolic rate (L) following i.p. injection with poloxamer 407 (1 g/kg bodyweight) (n=8-9 per group).

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ as compared to the control by t-test or two-way ANOVA as appropriate. Multiple comparisons were assessed by Fisher's LSD post-hoc test for (J). All data are shown as the means \pm SEM.

Figure_4

Figure 4. Lowering ApoF expression increases plasma VLDL-TG, but decreases hepatic TG secretion.

(A) Hepatic mouse ApoF mRNA in Ad-shLacZ or Ad-shApoF mice (n=8-9 per group). Plasma TC (B) and TG (C) in 5 hours fasted Ad-shLacZ or Ad-shApoF mice (n=8-9 per group). Fractionated pooled plasma cholesterol (D) and TG (E) by FPLC in 5 hours fasted Ad-shLacZ or Ad-shApoF mice (pool of 6 mice per group). Plasma TG (F) and calculation of TG production (G) and fractional catabolic rate (H) following i.p. injection with poloxamer 407 (1 g/kg bodyweight) (n= 7 per group). *** $p < 0.001$ as compared to the control by t-test or two-way ANOVA. Multiple comparisons were assessed by Fisher's LSD post-hoc test for (F). All data are shown as the means \pm SEM.

Figure_5

Figure 5. Human ApoF favors remnant particle clearance by increasing hepatic uptake.

(A) Baseline-corrected plasma TG after oral olive oil gavage in 5 hours fasted Ad-GFP or Ad-hApoF mice (n=9-10 per group). (B) Post-heparin plasma LPL and HL activities in overnight fasted Ad-GFP or Ad-hApoF mice (n=8 per group). Plasma ApoC-III (C) and correlation of plasma TG with plasma ApoC-III (D) in in 5 hours fasted Ad-GFP or Ad-hApoF mice (n=8 per group). Plasma ApoE (E) and ApoC-III/ApoE (F) ratio in 5 hours fasted Ad-GFP or Ad-hApoF

mice (n=8 per group). [3H] disappearance from plasma (G) and organ uptake (H) after i.v. injection of VLDL-like particles, double-labelled with glycerol tri[3H]oleate (TO) and [14C]cholesteryl oleate (CO) (n=7-8 per group). [14C] disappearance from plasma (I) and tissue uptake (J) after i.v. injection of VLDL-like particles, double-labelled with glycerol tri[3H]oleate and [14C]cholesteryl oleate (n=8 per group). *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 as compared to the control by t-test or two-way ANOVA. Multiple comparisons were assessed by Fisher's LSD post-hoc test for (A). r, Spearman's correlation coefficient. All data are shown as the means ± SEM. gWAT : gonadal white adipose tissue, iWAT : inguinal white adipose tissue, iBAT : interscapular brown adipose tissue, sBAT : subscapular brown adipose tissue.

Figure_6

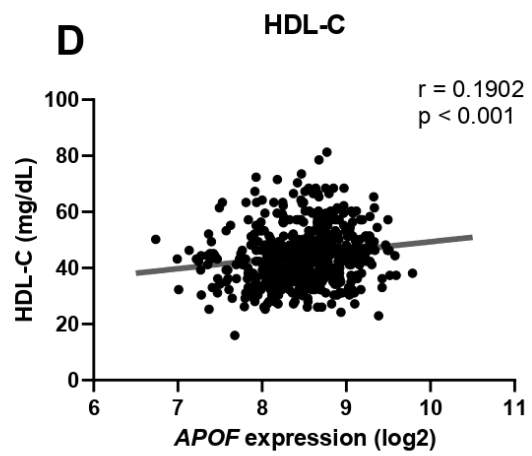
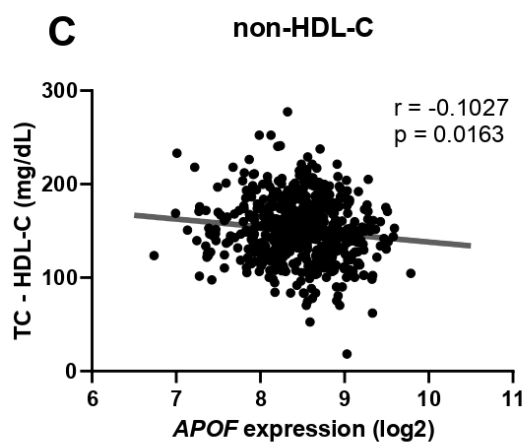
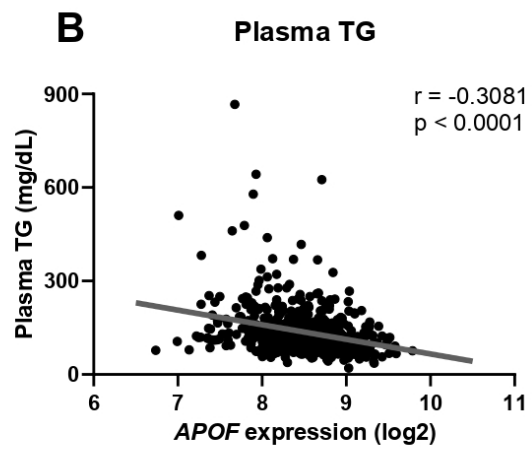
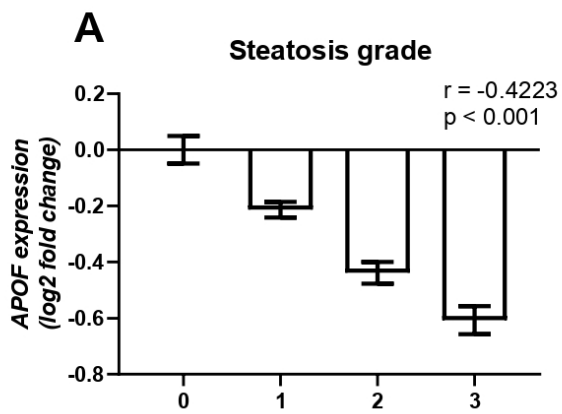
Figure 6. Downregulation of ApoF reduces hepatocyte Dil-VLDL and Dil-LDL uptake in vitro.

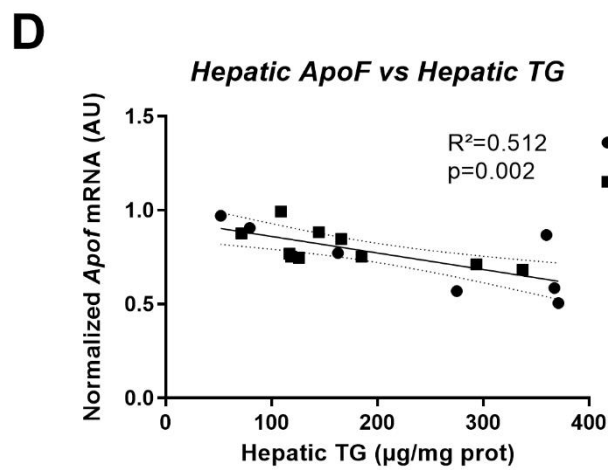
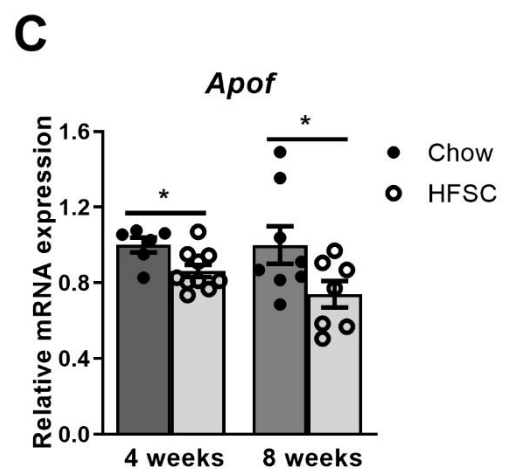
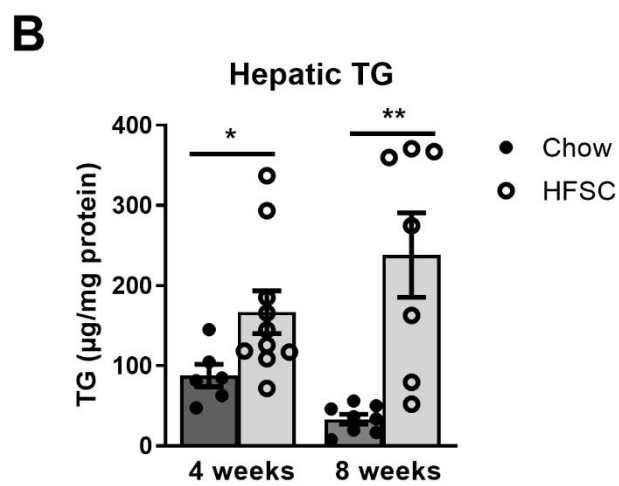
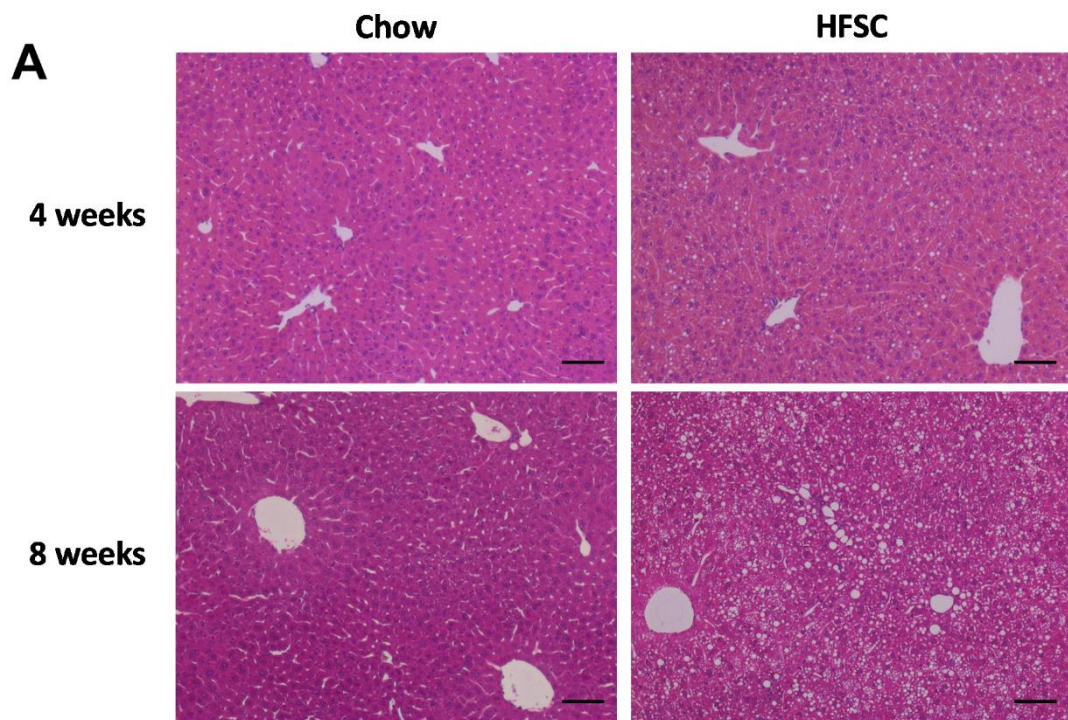
(A) ApoF mRNA in IHH transfected with siCtrl or siApoF after treatment with VLDL (n=10 per condition). (B) Intracellular fluorescence of Dil in siCtrl or siApoF IHH after overnight treatment with Dil-labeled VLDL (n=27 per conditions). (C) ApoF mRNA in IHH transfected with siCtrl or siApoF after treatment with LDL (n=3-4 per condition). (D) Intracellular fluorescence of Dil in siCtrl or siApoF IHH after 3 hours treatment with Dil-labeled LDL (n=12 per conditions). *p<0.05, ***p<0.001 as compared to the control by t-test. All data are shown as the means ± SEM from pooled experiments.

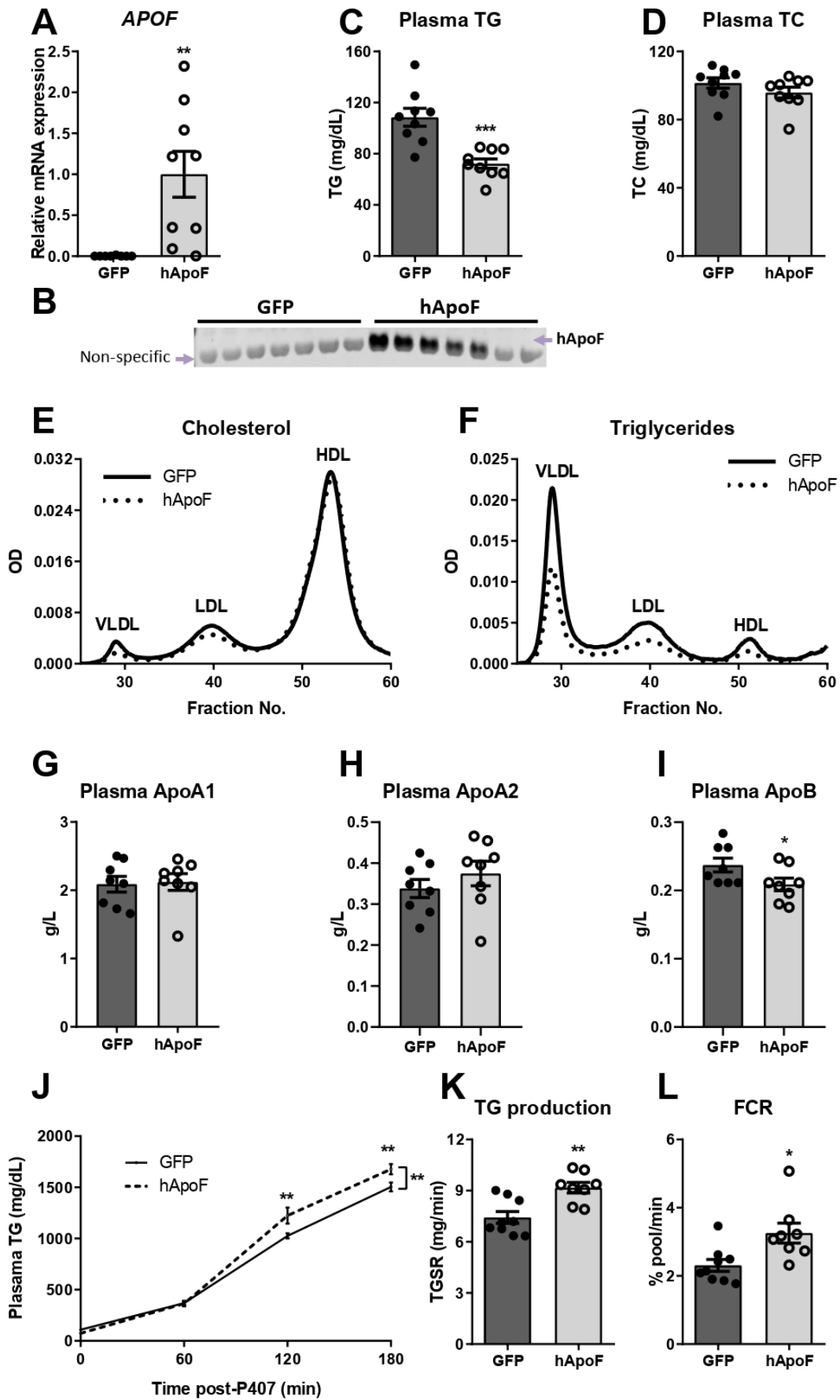
Figure_7

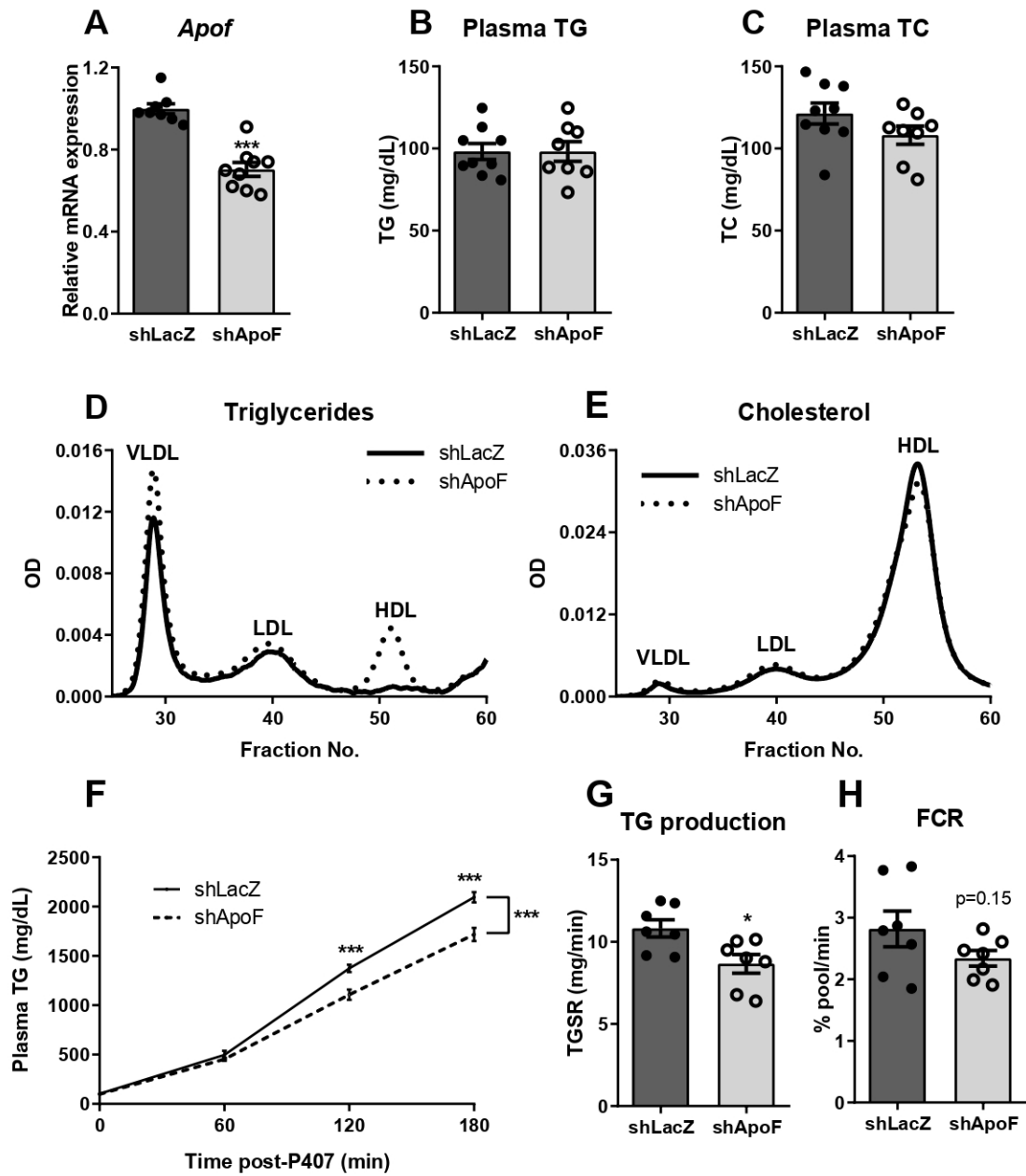
Figure 7. hApoF overexpression activates the SREBP2 pathway.

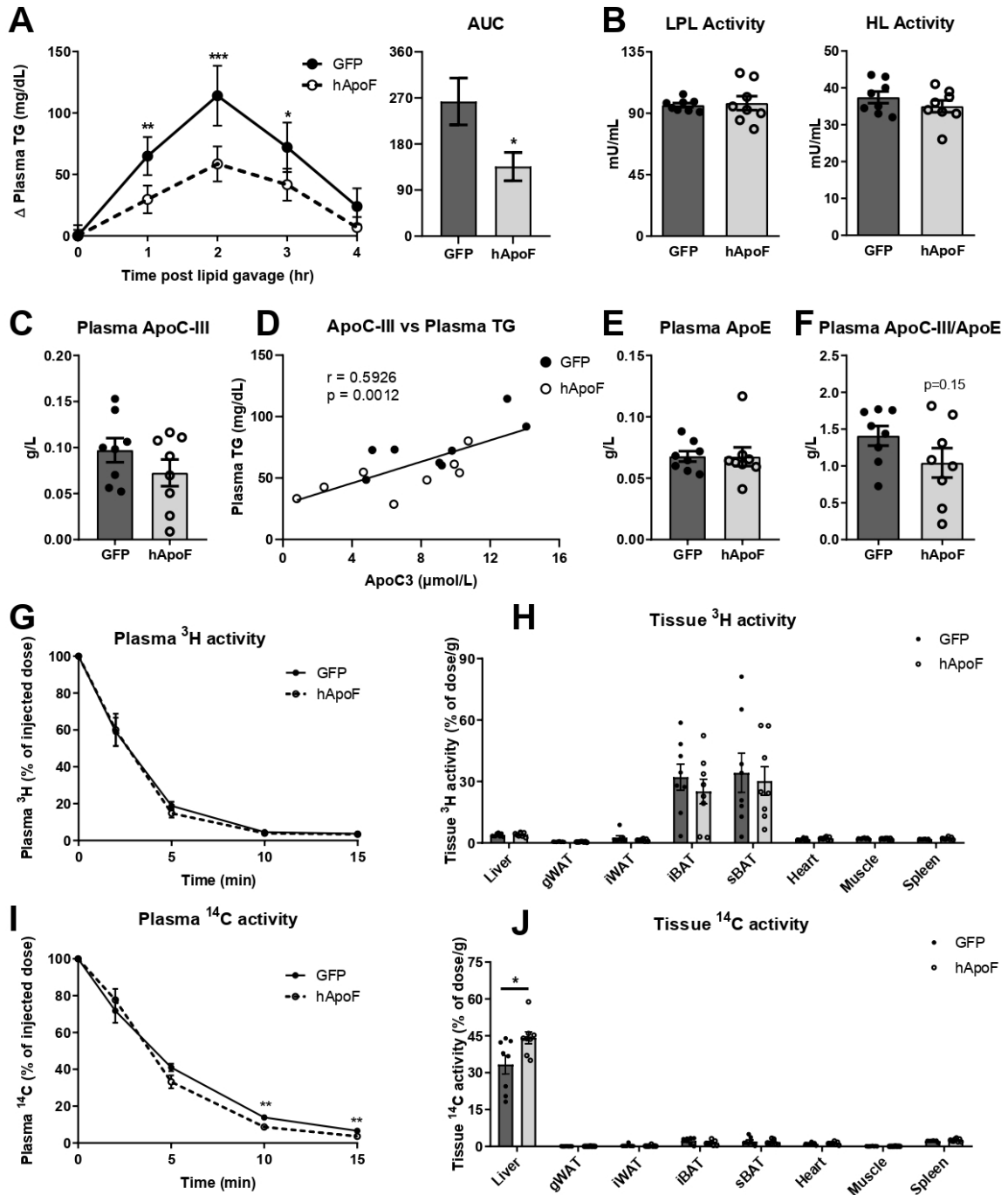
(A) Relative expression of genes related to cholesterol metabolism analyzed by microarray. (B) Gene set enrichment analysis using the top 100 upregulated genes by statin treatment in liver of mice overexpressing GFP or human ApoF.

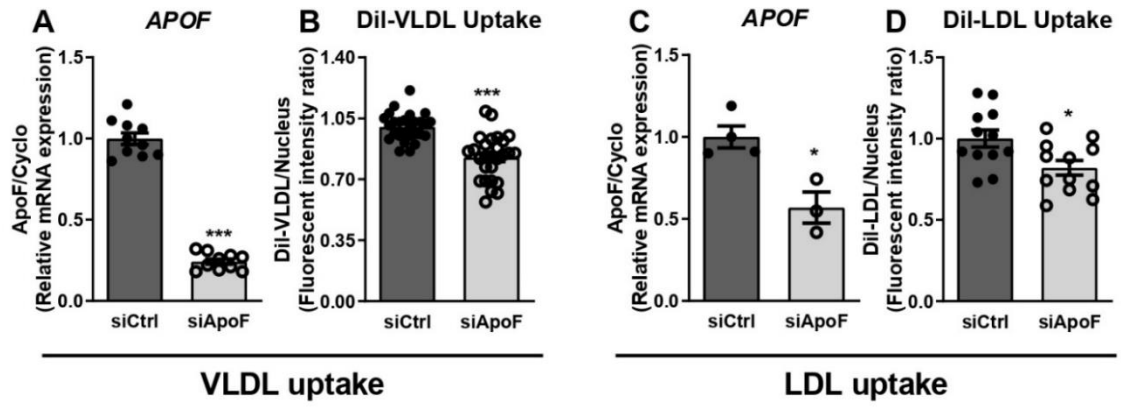






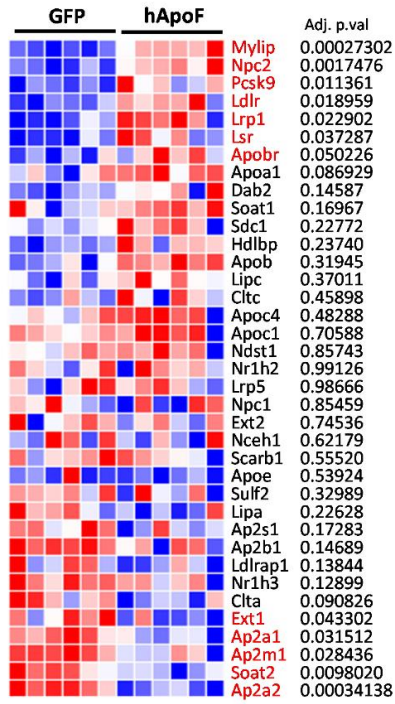






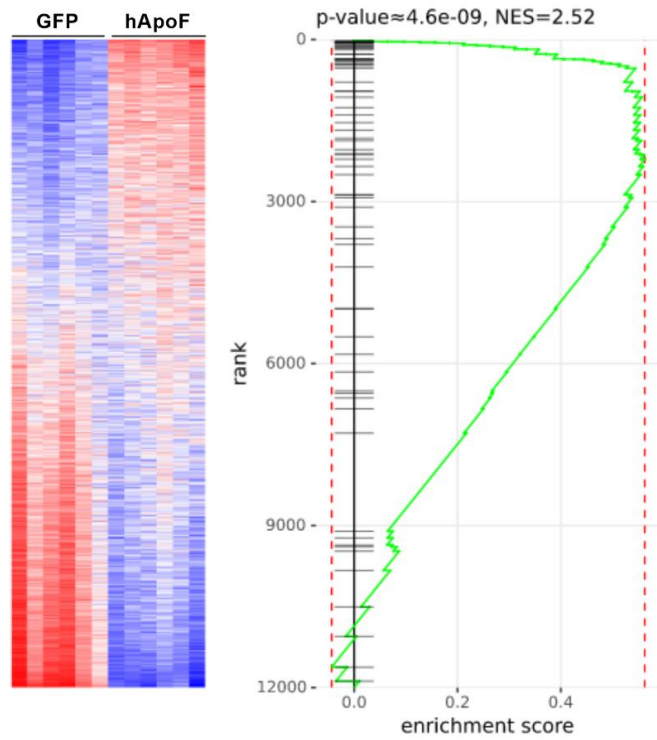
A

Cholesterol metabolism



B

Top 100 statin treatment liver upregulated genes



Detailed Methods

RNA/Quantitative PCR analysis

Total RNA was extracted with TRIzol (Invitrogen) according to manufacturer's instructions. Equal quantities of RNA were DNase treated (DNase I, ThermoFisher) and retrotranscribed (High-Capacity cDNA Reverse Transcription kit Applied Biosystems) according to manufacturer's protocols. Quantitative RT-PCR analysis was performed using Stratagene Brilliant II SYBR Green qPCR Master Mix with a Stratagene Mx3005P Real-Time PCR detection system (Agilent technologies). The RT-PCR primers are listed in **Table 1**.

Table 1 : RT-PCR primers for the indicated genes

Gene	Forward primer	Reverse primer
Murine ApoF	TGGCCGGACTGTATGGGTG	CTCTCCGTGTGAAGTGGCAT
Human ApoF	ACCCCTTGTCTGCAATTT	CCAGGGCATTCTTAGAGCC
Cyclophilin A	GCATACGGGTCTGGCATCTTGTC	ATGGTGATCTTCTTGCTGGTCTTGC
36B4	CATGCTCAACATCTCCCCCTTCTCC	GGGAAGGTGTAATCCGTCTCCACAG

Microarray analysis

Total RNA was extracted from livers of mice overexpressing GFP or hApoF (6 mice per group) as described above. RNA quantity and quality were assessed using the Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Biotechnologies). Transcriptome analysis was performed using Affymetrix GeneChip MoGene 2.0 ST arrays as described previously(1). Quality controls were verified using the Affymetrix expression console.

Microarray data processing

Microarray data were normalized by robust multi-average method using the package oligo/Bioconductor. For preprocessing, probesets were to symbols selecting the highest expressed probe when multiple probes mapped to a given gene. Differential gene expression analysis was performed on the 12000 highest expressed genes using limma (2). Gene set enrichment analysis was performed in EnrichR (3) using Bioplanet annotations.

Western blot analysis

Western blot analysis was performed on 2µL of plasma with antibodies against human ApoF(4). Primary antibodies were detected using IRDye secondary antibodies (LI-COR Biosciences, Lincoln, USA). Band intensity was defined as sum of the pixel intensity in the band after background subtraction using Image Studio Lite v5.2.

Cell culture studies

Immortalized Human Hepatocytes (IHH) were cultured in William's E media as described previously(5). In knockdown experiments, IHH cells were transfected with ApoF siRNA (ON-TARGETplus Human APOF siRNA L-011576-00-0005) or non-targeting siRNAs using Dharmafect 1 transfection reagent (Horizon discovery) according to manufacturer's instructions.

Lipid and lipoprotein analyses

Plasma TG and total cholesterol were measured using colorimetric assays (BioMerieux, France) according to manufacturer's protocol. Lipoprotein fractions were separated by fast-performance liquid chromatography (FPLC) on a Waters 2695 Acquity pump system with a Superose 6 10/300 GL gel filtration column (GE Healthcare). Total TG and cholesterol measurements were performed using an in-line column reaction module with measurement at 490 nm by a spectrophotometric detector.

Dil-labeled VLDL and LDL uptake assay

Human VLDL and LDL particles were labeled with the fluorescent phospholipid analog 1,10-dioctadecyl-3,3,30,30-tetramethylindocarbocyanine perchlorate (Dil) as described(6). IHH cells were incubated with 10 µg Dil-labeled VLDL or 1 µg Dil-labeled LDL (CliniSciences) for 16 or 3 hours, respectively. Cells were washed with PBS, fixed with 4% paraformaldehyde and labeled with 1 µg/mL Hoechst (ThermoFischer Scientific). Fluorescence was measured using a TECAN plate reader. Dil-particle uptake was calculated as the ratio of Dil/Hoechst fluorescence.

Lipoprotein Lipase and Hepatic Lipase activity assay

After overnight fast, plasma was collected 10 min after heparin injection (CHOAY, 0.1 U/g bodyweight in saline). Post-heparin lipase activity measurements were performed by CEREMET (University of Barcelona, Spain) as described(7,8). Total lipase activity was measured with and without addition of 1M NaCl. LPL-specific activity was estimated as the difference between low salt lipase activity (total) and high salt activity (corresponding to hepatic lipase).

Apolipoprotein quantification

Fasting plasma ApoA-I ApoA-II, total ApoB (B100 and B48), ApoC-III and ApoE were quantified by liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis of specific peptides adapted for murine samples (Supplemental Table 1) as described previously (9).

Post-prandial lipid response

Tail blood samples were taken from 5 hour-fasted mice before and 1, 2, 3 and 4 hours after oral gavage of 400 µL of olive oil and TG levels measured. Data are presented as the delta from T0 for both genotypes.

Adenovirus Studies

Ad5-adenovirus vectors (Ad-GFP, Ad-hApoF, Ad-shLacZ and Ad-shApoF) were produced at GeneCust (Luxembourg), amplified and purified by two-step CsCl₂ gradient ultracentrifugation as described previously(10). Unless otherwise indicated, mice received

intravenous injections of 1×10^{10} purified viral particles in 100 μ L sterile saline. Metabolic analysis was performed on the 4th day following injection. In all experiments, fasting plasma was obtained by retro-orbital bleeding after inhaled isoflurane anesthesia or by tail bleed without anesthesia. All experiments were approved by the Ethical Committee for Animal Experimentation for Hauts de France (APAFIS#5746-2016040109244171v2).

Hepatic VLDL-TG secretion analysis

Mice were fasted for 5 hours before the assay and tail blood was collected for baseline TG levels. Tail blood was collected at 60, 120 and 180 min after intraperitoneal injection of 250 μ L 10% Poloxamer 407 (P407, Sigma 16758-250g) in saline for measurement of plasma TG. Fractional catabolic rates (FCR) were calculated as TG secretion rate (TGSR) divided by the plasma TG pool size(11).

Plasma volume (mL)= BW (g) \times 0.033

TGSR (mg/min)=((TG(180)-TG(60)) \times Plasma volume)/120

FCR(pool/min)=(TGSR (mg/min))/(TG(0) \times Plasma volume)

TG(time): plasma TG concentrations (mg/mL) at given time after P407 injection

VLDL-like particle uptake assay

VLDL1-like TG-rich emulsion particles (80 nm) labelled with glycerol tri[³H]oleate (TO) and [¹⁴C]cholesteryl oleate (CO) were prepared as described(12).

Briefly, fasted mice (5hrs) were injected intravenously with 200 μ L of radiolabeled emulsion. Blood was collected prior to and 2, 5, 10, and 15 min after injection to measure plasma decay of [³H]TO and [¹⁴C]CO. The mice were killed by cervical dislocation, perfused with ice-cold PBS and several tissues were harvested. Organ uptake of radioactivity was determined by dissolving organs in Tissue Solubilizer (Amersham Biosciences, Roosendaal, the Netherlands) at 55°C overnight. Radioactive counts were normalized to tissue weight in grams.

SUPPLEMENTAL MATERIAL

Supplemental Table 1. Multiple reaction monitoring (MRM) parameters used for the detection of apolipoprotein peptide biomarkers by mass spectrometry.

Apolipoprotein	Peptide	MRM transition (<i>m/z</i>)	Cone/collision (V)
ApoA1	VAPLGAELQESAR	671.4 \rightarrow 586.3 (y_{11}^{2+})	40/23
ApoA1 (IS)	VAPLGAELQESA-[¹³ C ₆ , ¹⁵ N ₄]R	676.4 \rightarrow 591.3 (y_{11}^{2+})	40/23
ApoA2	THEQLTPLVR	597.7 \rightarrow 955.8 (y_8^+)	40/30
ApoA2 (IS)	THEQLTPLV-[¹³ C ₆ , ¹⁵ N ₄]R	602.7 \rightarrow 960.8 (y_8^+)	40/30
ApoB	INIDIPLPLGGK	625.9 \rightarrow 681.5 (y_7^+)	30/24
ApoB (IS)	INIDIPLPLGGK-[¹³ C ₆ , ¹⁵ N ₂]K	629.9 \rightarrow 689.5 (y_7^+)	30/24
ApoC3	GWMDNHFR	532.1 \rightarrow 819.8 (y_6^+)	30/25
ApoC3 (IS)	GWMDNHF-[¹³ C ₆ , ¹⁵ N ₄]R	537.1 \rightarrow 829.8 (y_6^+)	30/25

ApoE	TANLGAGAAQPLR	620.8 → 840.5 (y ₉ ⁺)	30/25
ApoE (IS)	TANLGAGAAQPL-[¹³ C ₆ . ¹⁵ N ₄]R	625.8 → 850.5 (y ₉ ⁺)	30/25

IS. internal standard.

Supplemental Table 2: Top 20 transcripts positively (left) and negatively (right) correlated with hepatic steatosis.

Gene	ρ	p-value	Gene	ρ	p-value
<i>FAT1</i>	0.499	4.60E-36	<i>DNAJC12</i>	-0.471	1,06E-31
<i>PRAMEF10</i>	0.450	8.12E-29	<i>NUDT13</i>	-0.458	5,80E-30
<i>KRT8</i>	0.443	7.23E-28	<i>VIL1</i>	-0.429	4,74E-26
<i>SULF2</i>	0.435	7.31E-27	<i>APOF</i>	-0.426	1,05E-25
<i>LPL</i>	0.424	1.90E-25	<i>SLC16A10</i>	-0.404	5,30E-23
<i>TMEM19</i>	0.412	5.20E-24	<i>P4HA1</i>	-0.394	6,06E-22
<i>KRT18</i>	0.410	9.37E-24	<i>CENPV</i>	-0.389	2,21E-21
<i>MACROH2A2</i>	0.407	2.02E-23	<i>PDIA5</i>	-0.389	2,42E-21
<i>TMEM154</i>	0.402	8.07E-23	<i>TNIK</i>	-0.385	7,03E-21
<i>ZMAT3</i>	0.401	1.09E-22	<i>PELI2</i>	-0.377	4,74E-20
<i>ME1</i>	0.400	1.28E-22	<i>RGS5</i>	-0.374	9,47E-20
<i>FCAMR</i>	0.400	1.42E-22	<i>UHRF2</i>	-0.374	9,66E-20
<i>ANKRD18A</i>	0.399	1.74E-22	<i>RBMS1</i>	-0.372	1,59E-19
<i>GNA12</i>	0.398	2.56E-22	<i>MIR4785</i>	-0.372	1,59E-19
<i>FABP4</i>	0.397	3.33E-22	<i>CD82</i>	-0.372	1,69E-19
<i>SATB2</i>	0.393	7.93E-22	<i>TCF7L1</i>	-0.368	4,07E-19
<i>SERPINB8</i>	0.393	9.71E-22	<i>PACSIN3</i>	-0.367	5,38E-19
<i>MIR622</i>	0.392	1.24E-21	<i>PTPRD</i>	-0.366	7,39E-19
<i>CDKN1A</i>	0.386	4.93E-21	<i>ECE1</i>	-0.364	9,66E-19
<i>TP53I3</i>	0.385	6.49E-21	<i>RAB30-DT</i>	-0.358	4,31E-18

Supplemental Table 3 : Correlation of hepatic *APOF* expression with clinical parameters.

Parameter	Spearman ρ	p-value
Age	0.015	0.7292
BMI	-0.067	0.1192
Weight	-0.126	0.0032
TC	-0.051	0.2328
HDL-C	0.190	<0.0001
LDL-C	-0.002	0.9544
TG	-0.308	<0.0001

Fasting plasma glucose	-0.161	0.0002
HOMA2-IR	-0.051	0.2583
HbA1c	-0.234	<0.0001
Total bilirubin	0.038	0.3783
ASAT	-0.308	<0.0001
ALAT	-0.385	<0.0001
gGT	-0.323	<0.0001
alpha2-macroglobulin	-0.094	0.0276
Haptoglobin	0.101	0.0185
ApoA1	0.049	0.2556
Ultrasensitive CRP	0.094	0.0455

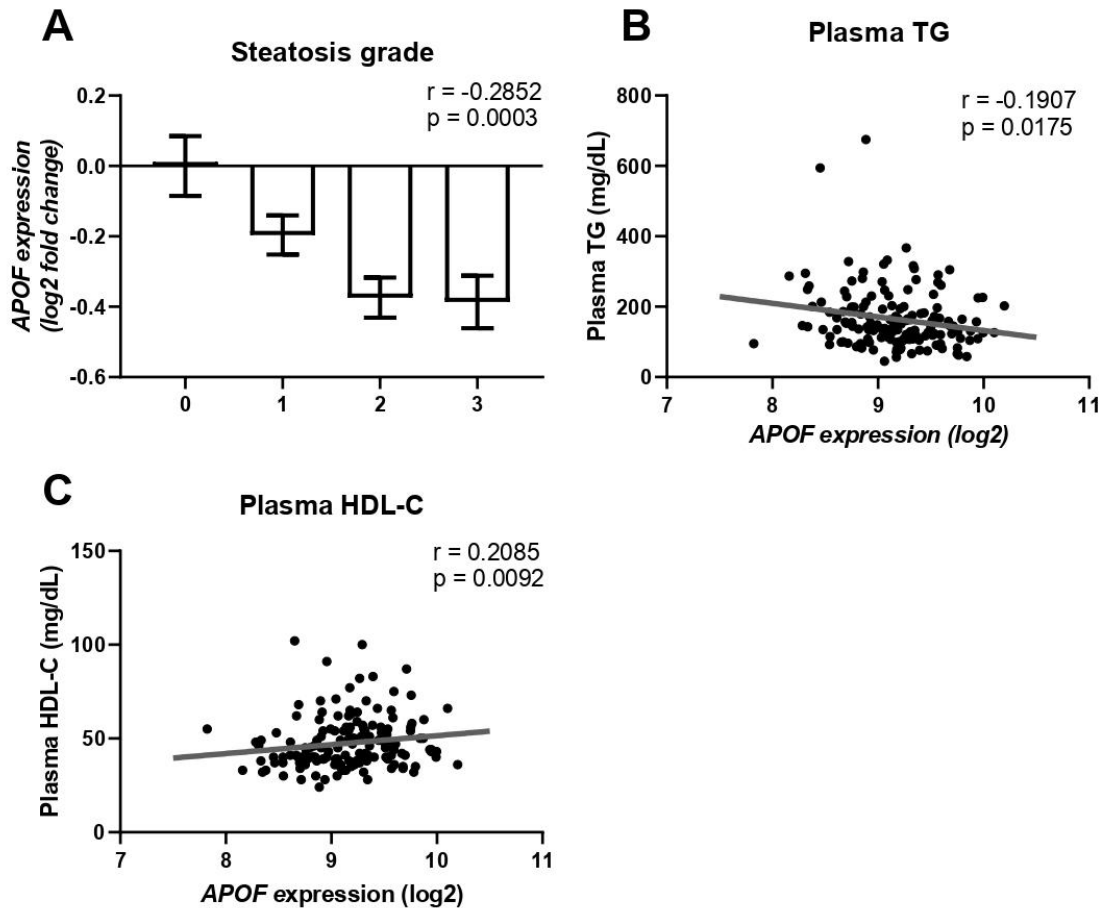
Supplemental Table 4: Top 20 transcripts positively (left) and negatively (right) correlated with plasma TG.

Gene	ρ	p-value	Gene	ρ	p-value
<i>FAT1</i>	0.379	3.79E-20	<i>APOF</i>	-0.315	4.07E-14
<i>ZMAT3</i>	0.340	2.37E-16	<i>DNAJC12</i>	-0.314	5.41E-14
<i>SATB2</i>	0.324	7.21E-15	<i>P4HA1</i>	-0.298	9.45E-13
<i>WDPCP</i>	0.310	1.13E-13	<i>SOCS2</i>	-0.297	1.18E-12
<i>DEFB1</i>	0.303	3.70E-13	<i>SERPINA1</i>	-0.290	4.25E-12
<i>MAMDC4</i>	0.295	1.59E-12	<i>TENM3</i>	-0.276	4.56E-11
<i>TMEM19</i>	0.292	2.88E-12	<i>C9</i>	-0.276	4.98E-11
<i>SQLE</i>	0.290	4.46E-12	<i>DIPK2A</i>	-0.273	7.35E-11
<i>ANKRD18A</i>	0.284	1.21E-11	<i>PC</i>	-0.272	9.75E-11
<i>ME1</i>	0.279	2.78E-11	<i>CD82</i>	-0.264	3.23E-10
<i>ANKRD18B</i>	0.278	3.29E-11	<i>SERPINA3</i>	-0.262	4.56E-10
<i>HMGCS1</i>	0.276	4.89E-11	<i>NUDT13</i>	-0.261	4.93E-10
<i>PDE11A</i>	0.272	9.21E-11	<i>SOCS2-AS1</i>	-0.256	1.23E-09
<i>PTPN11</i>	0.271	1.10E-10	<i>IGF1</i>	-0.255	1.31E-09
<i>DDB2</i>	0.269	1.38E-10	<i>PTPRD</i>	-0.251	2.37E-09
<i>ACLY</i>	0.269	1.41E-10	<i>C8A</i>	-0.246	5.56E-09
<i>TARBP1</i>	0.266	2.51E-10	<i>MYOM1</i>	-0.245	6.05E-09
<i>FASN</i>	0.263	4.15E-10	<i>TIMD4</i>	-0.243	7.74E-09
<i>MEAF6</i>	0.263	4.18E-10	<i>PHF8</i>	-0.241	1.12E-08
<i>NSDHL</i>	0.260	6.48E-10	<i>IGFALS</i>	-0.240	1.29E-08

Supplemental Table 5 : Gene set enrichment analysis of the 250 most upregulated genes by hepatic *APOF* overexpression.

Term	P-value	Adjusted P-value	Odds Ratio	Combined Score	Genes
Cholesterol biosynthesis	3.3E-10	2.0E-07	40.8	890.2	<i>FDPS, SQLE, PMVK, MSMO1, HMGCR, HSD17B7, LSS, TM7SF2</i>
Metabolism	1.8E-06	5.4E-04	2.4	31.8	<i>PDXK, ACSS2, ALAS1, ACSM1, HAAO, PON1, MSMO1, GLYAT, HMGCR, HSD17B7, PIK3C2A, ACACB, TM7SF2, HSD11B1, DPP4, C1GALT1C1, PMVK, RDH16, PLCG1, PCK1, PRODH, GLUL, ATP6V0A1, HS3ST3B1, FDPS, CYB5A, PHYH, GFPT1, URAD, UPB1, ACADSB, MUT, LSS, SQLE, ETNK1, DPYD, PCCB, POLR3G, ALDOC, LAP3, LPIN2, SLC27A5, GNE</i>
Lipid and lipoprotein metabolism	3.8E-06	7.6E-04	3.6	44.6	<i>FDPS, STARD4, PHYH, STARD5, ALAS1, MSMO1, HMGCR, HSD17B7, PIK3C2A, ACACB, MUT, LSS, TM7SF2, HSD11B1, SQLE, ETNK1, PCCB, PMVK, LPIN2, SLC27A5</i>
Steroid biosynthesis	1.6E-05	0.002	19.2	212.3	<i>SQLE, MSMO1, HSD17B7, LSS, TM7SF2</i>
Angiogenesis	1.8E-04	0.021	16.9	146.1	<i>KDR, PLCG1, TEK, VEGFA</i>
Gamma-carboxylation. transport. and amino-terminal cleavage of proteins	3.0E-04	0.028	30.0	243.6	<i>F7, PROS1, PROZ</i>
Activation of chaperones by IRE1 alpha	3.2E-04	0.028	9.4	75.2	<i>TSPYL2, DNAJC3, GFPT1, DNAJB9, PDIA5</i>
Vitamin B12 metabolism	4.7E-04	0.035	8.6	65.5	<i>CRP, F7, INSR, SOD2, MUT</i>
Response to elevated platelet cytosolic calcium	6.1E-04	0.040	6.3	46.5	<i>APP, PROS1, HGF, HRG, KNG1, VEGFA</i>

Propanoate metabolism	7.3E-04	0.043	11.1	79.8	<i>ACSS2, PCCB, ACACB, MUT</i>
Terpenoid backbone biosynthesis	7.9E-04	0.043	20.0	142.8	<i>FDPS, PMVK, HMGCR</i>



Supplemental Figure 1. Hepatic APOF expression is negatively correlated with steatosis and dyslipidemia in a cohort of obese patients.

(A) Normalized hepatic APOF mRNA expression in relation with stage of steatosis in obese patients. Relationship of plasma TG (B) and HDL-C (C) with hepatic APOF expression in a cohort of obese patients (n=155). r, Spearman's correlation coefficient. Data from (A) are shown as the log2 fold change compared to grade 0 ± SEM.

- Haas JT, Vonghia L, Mogilenko DA, Verrijken A, Molendi-Coste O, Fleury S, et al. Transcriptional Network Analysis Implicates Altered Hepatic Immune Function in NASH development and resolution. *Nat Metab.* 2019;1:604–614.

2. Phipson B, Lee S, Majewski IJ, Alexander WS, Smyth GK. ROBUST HYPERPARAMETER ESTIMATION PROTECTS AGAINST HYPERVARIABLE GENES AND IMPROVES POWER TO DETECT DIFFERENTIAL EXPRESSION. *Ann Appl Stat.* 2016;10:946–963.
3. Chen EY, Tan CM, Kou Y, Duan Q, Wang Z, Meirelles GV, et al. Enrichr: interactive and collaborative HTML5 gene list enrichment analysis tool. *BMC Bioinformatics.* 2013;14:128.
4. Lagor WR, Brown RJ, Toh S-A, Millar JS, Fuki IV, de la Llera-Moya M, et al. Overexpression of apolipoprotein F reduces HDL cholesterol levels in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009;29:40–46.
5. Samanez CH, Caron S, Briand O, Dehondt H, Duplan I, Kuipers F, et al. The human hepatocyte cell lines IHH and HepaRG: models to study glucose, lipid and lipoprotein metabolism. *Arch Physiol Biochem.* 2012;118:102–111.
6. Stephan ZF, Yurachek EC. Rapid fluorometric assay of LDL receptor activity by Dil-labeled LDL. *J Lipid Res.* 1993;34:325–330.
7. Ehnholm C, Kuusi T. Preparation, characterization, and measurement of hepatic lipase. *Methods Enzymol.* 1986;129:716–738.
8. Julve J, Robert MQ, Llobera M, Peinado-Onsurbe J. Hormonal regulation of lipoprotein lipase activity from 5-day-old rat hepatocytes. *Mol Cell Endocrinol.* 1996;116:97–104.
9. Blanchard V, Garçon D, Jaunet C, Chemello K, Billon-Crossouard S, Aguesse A, et al. A high-throughput mass spectrometry-based assay for large-scale profiling of circulating human apolipoproteins. *J Lipid Res.* 2020;61:1128–1139.
10. Tollefson AE, Kuppuswamy M, Shashkova EV, Doronin K, Wold WSM. Preparation and titration of CsCl-banded adenovirus stocks. *Methods Mol Med.* 2007;130:223–235.
11. Asset G, Baugé E, Wolff RL, Fruchart JC, Dallongeville J. Pinus pinaster oil affects lipoprotein metabolism in apolipoprotein E-deficient mice. *J Nutr.* 1999;129:1972–1978.
12. Berbée JFP, Boon MR, Khedoe PPSJ, Bartelt A, Schlein C, Worthmann A, et al. Brown fat activation reduces hypercholesterolaemia and protects from atherosclerosis development. *Nat Commun.* 2015;6:6356.