



HAL
open science

Rôle de l'hépatokine LECT2 dans l'immunométabolisme du foie

Céline Pophillat

► **To cite this version:**

Céline Pophillat. Rôle de l'hépatokine LECT2 dans l'immunométabolisme du foie. Immunologie. Université Paris Cité, 2023. Français. NNT : 2023UNIP5268 . tel-04764552

HAL Id: tel-04764552

<https://theses.hal.science/tel-04764552v1>

Submitted on 4 Nov 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.

Université Paris Cité

École doctorale n°562 – Bio Sorbonne Paris Cité (BioSPC)

Centre de Recherche des Cordeliers INSERM UMRS1138

Équipe « Prolifération, Stress et Physiopathologie Hépatique »

Rôle de l'hépatokine LECT2 dans l'immunométabolisme du foie

par

Céline Oana Fauve POPHILLAT

THESE DE DOCTORAT D'IMMUNOLOGIE

Dirigée par le Professeur Jean-Pierre COUTY

Présentée et soutenue publiquement à Paris

le 14 décembre 2023

devant un jury composé de

Rapporteurs	Béatrice BAILLY-MAÎTRE	CRCN	Université Côte d'Azur
	Thomas GAUTIER	CRCN	Université de Bourgogne
Examineurs	Hélène GILGENKRANTZ	DR2	Université Paris Cité
	Mathilde VARRET	CRCN	Université Paris Cité
	Jean-Charles NAULT	PUPH	Université Sorbonne Paris Nord
Membre invité	Joel HAAS	DR2	Université de Lille
Directeur de thèse	Jean-Pierre COUTY	PU	Université Paris Cité

RÉSUMÉ

Rôle de l'hépatokine LECT2 dans l'immunométabolisme du foie

Le foie est un site privilégié de régulation du métabolisme permettant le maintien de l'homéostasie énergétique. Des altérations de ses propriétés favorisent la stéatose, une des composantes des maladies stéatosiques non-alcooliques du foie (NAFLD), constituant une nouvelle épidémie mondiale. Ces travaux de thèse mettent en évidence un rôle nouveau de l'hépatokine LECT2 dans la régulation du métabolisme du cholestérol dans un contexte physiologique et pathologique. A l'aide de modèles murins génétiquement modifiés, dans des conditions de régime standard, ces travaux démontrent que LECT2 exerce ses effets sur la lipogenèse hépatique et le catabolisme du cholestérol spécifiquement par le biais d'une signalisation dépendant de LXR-SREBP1c. Dans des conditions pathologiques de stéatose, nos résultats démontrent que *Lect2* est induit dans les foies stéatosiques des patients atteints de NAFLD et de modèles murins mimant la NAFLD. De façon intéressante, nos résultats démontrent que LECT2 régule l'homéostasie du cholestérol et protège également contre le dysfonctionnement mitochondrial. De façon importante, nos résultats révèlent que l'expression de *Lect2* protège de la sévérité de la NASH en atténuant à la fois la réponse inflammatoire et la lipotoxicité dans un régime de surcharge en cholestérol. Enfin, nos résultats démontrent que LECT2, grâce à ses propriétés immunitaires et métaboliques, est un acteur essentiel de la séquence stéatose-stéatohépatite et qu'il a des fonctions suppressives de tumeurs chez la souris, car son absence à long terme entraîne le développement de tumeurs hépatiques.

Collectivement, ces travaux de thèse illustrent LECT2 comme un acteur moléculaire fondamental exerçant des propriétés duelles, régulant à la fois le métabolisme lipidique et l'inflammation du tissu hépatique. LECT2 pourrait constituer une cible innovante pour améliorer le traitement des NAFLD.

Mots-clés : foie, stéatose, métabolisme du cholestérol, hépatokine, LECT2, LXR, NAFLD.

ABSTRACT

Role of the hepatokine LECT2 in the liver immunometabolism

The liver is a key site of metabolic regulation, helping to maintain energy homeostasis. Alterations in its properties promote steatosis, one of the components of non-alcoholic fatty liver diseases (NAFLD), a new global epidemic. This thesis highlights a novel role for the hepatokine LECT2 in the regulation of cholesterol metabolism in both physiological and pathological contexts. Using genetically modified mouse models, under standard diet conditions, this work demonstrates that LECT2 exerts its effects on hepatic lipogenesis and cholesterol catabolism specifically through LXR-SREBP1c-dependent signaling. Under pathological conditions of steatosis, our results demonstrate that *Lect2* is induced in steatotic livers of NAFLD patients and mouse models mimicking NAFLD. Interestingly, our results demonstrate that LECT2 regulates cholesterol homeostasis and protects against mitochondrial dysfunction. Importantly, our results reveal that *Lect2* expression protects against NASH severity by attenuating both the inflammatory response and lipotoxicity in a cholesterol-overload diet. Finally, our results demonstrate that LECT2, due to its immune and metabolic properties, is an essential player in the steatosis-steatohepatitis sequence and that it retains tumor-suppressive functions in mice, since its long-term absence under NAFLD diet leads to the development of liver tumors.

Collectively, this thesis work illustrates LECT2 as a fundamental molecular player with dual properties, regulating both lipid metabolism and inflammation in liver tissue. LECT2 could be an innovative target for improving the treatment of non-alcoholic fatty liver diseases.

Keywords : liver, steatosis, cholesterol metabolism, hepatokine, LECT2, LXR, NAFLD.

« Je suis de ceux qui pensent que la Science est d'une grande beauté. Un scientifique dans son laboratoire n'est pas seulement un technicien : c'est aussi un enfant placé en face des phénomènes naturels qui l'impressionnent comme un conte de fées. Nous ne devons pas laisser croire que tout progrès scientifique se réduit à des mécanismes, des machines, des engrenages, qui, d'ailleurs, ont aussi leur beauté propre. Je ne crois pas non plus que, dans notre monde, l'esprit d'aventure risque de disparaître. Si je vois autour de moi quelque chose de vital, c'est précisément cet esprit d'aventure qui paraît indéradicable et s'apparente à la curiosité. Sans la curiosité de l'esprit, que serions-nous ? Telle est bien la beauté et la noblesse de la science : désir sans fin de repousser les frontières du savoir, de traquer les secrets de la matière et de la vie sans idée préconçue des conséquences éventuelles. »

Marie Curie – 1934

« La vie n'est facile pour aucun de nous. Mais quoi, il faut avoir de la persévérance, et surtout de la confiance en soi. Il faut croire que l'on est doué pour quelque chose, et que, cette chose, il faut l'atteindre coûte que coûte. »

Marie Curie – 1894

REMERCIEMENTS

En premier lieu, je tiens à remercier l'ensemble des membres du **Jury** qui ont accepté avec enthousiasme d'évaluer mes travaux de thèse. Je tiens tout particulièrement à remercier **Béatrice Bailly-Maître** et **Thomas Gautier**, qui ont endossé le rôle de Rapporteurs, pour leur intérêt approfondi pour ce manuscrit. Je remercie également **Hélène Gilgenkrantz**, **Mathilde Varret**, **Jean-Charles Nault** et **Joel Haas**, les Examineurs de ces travaux.

*Cette thèse est le résultat de 4 années de travail, mais en réalité c'est le rêve de toute une vie qui se réalise. Les Sciences m'ont toujours attirée, et mes aspirations ont fluctué entre archéologie, ornithologie, astronomie et biologie. Plus tard, j'avais pour objectif de devenir astrophysicienne, mais à cause (ou grâce !) à des mauvaises notes à répétition en cours de physique, je me suis dirigée vers la biologie et elle ne m'a plus quittée. Déjà en Terminale, j'avais jeté mon dévolu sur le Master 2 Recherche d'Immunologie proposé anciennement par l'Université Paris Diderot, et après une licence en Sciences de la Vie à l'Université d'Evry Val d'Essonne, me voilà arrivée à Paris, dans le cours Hôtes Pathogènes du **Professeur Jean-Pierre Couty**. Mon souvenir n'est plus très précis, mais il me semble que notre première interaction fut un commentaire de ma part pendant le premier cours, auquel il eut répondu quelque chose de l'ordre de « c'est très bien, vous réfléchissez Mademoiselle ! ». Le destin fut finalement scellé lorsqu'il me proposa de faire mon stage de Master 2 puis ma thèse sous sa supervision.*

J'aimerais aujourd'hui te remercier **JP** de tout ce que tu m'as offert pendant ces 5 années à tes côtés. Tout d'abord, malgré les contraintes associées à tes fonctions, tu as toujours été présent pour discuter, que ce soit de sciences ou de la vie de tous les jours. J'ai toujours apprécié nos discussions, qu'elles aient duré 15 minutes ou 5 heures, et j'espère qu'il y en aura encore après la conclusion de ces travaux. Merci pour ton soutien inconditionnel, tes encouragements, ton enthousiasme, pour la confiance que tu m'as accordée et pour la liberté que tu m'as laissée et qui est essentielle pour l'apprentissage dans la vie d'un jeune chercheur. Grâce à toi j'ai pu trouver ma voie, gagner en assurance et en confiance en moi. Cela a été un plaisir de travailler avec toi, et malgré notre tendance commune à toujours (trop) critiquer ce que nous faisons, nous avons mené à bien ce projet et ouvert de nombreuses pistes très intéressantes à poursuivre. Je suis très admirative de tout ce que tu accomplis tous les jours, entre 1000 contraintes, et j'ai beaucoup appris à tes côtés. Je voulais également te remercier pour tout ton soutien hors labo, pour tous les mots gentils et les

attentions qui ont su me remonter le moral quand j'en avais besoin. En plus d'être enrichissante scientifiquement, cette thèse a également été une très grande leçon de vie, et tu as été présent pour me guider entre les étapes. Merci pour tout !

Un grand merci également à **Chantal Desdouets**, pour ton accueil dans ton équipe, pour ton soutien à la fois scientifique et technique tout au long de ce projet, et pour tout le reste au quotidien.

Ces 5 années au labo ont été riches en évènements, et j'ai eu l'immense plaisir d'être entourée de personnes formidables qui ont été à la fois un soutien immense et un puits sans fond de franche rigolade.

À celles qui m'ont tout appris, **Sandrine** et **Mathilde**, un immense merci ! Sandrine, tu m'as transmis ta rigueur, ton sens de l'organisation, ta capacité à être multi-tâches et je suis honorée d'avoir pu continuer tes travaux sur LECT2. Merci pour tout l'investissement dont tu as fait preuve pour me préparer au travail en laboratoire, tu as une immense pédagogie que j'ai essayé de manifester à mon tour quand j'ai eu l'occasion de former de nouvelles personnes. Mathilde, tu m'as appris tout ce qui touche à l'immunologie dans le labo, et tu m'as insufflé ta persévérance, ton sens du détail (qui est devenu très, voire trop pointu par la suite !) et ton efficacité toujours réfléchi et jamais précipitée. Vous avez construit des fondations solides grâce à vos expériences combinées, et je vous en remercie du fond du cœur !

Merci aux anges gardiens du labo, à savoir **Séverine** et **Isabelle**, premièrement pour leurs attentions sucrées qui se matérialisent par magie dans la salle à manger, et surtout pour leur aide inconditionnelle, qu'il pleuve, qu'il vente, dans le désert ou sur la Lune, on peut compter sur vous à n'importe quel obstacle. Merci pour tout ce que vous faites pour nous tous les jours, pour vos conseils scientifiques, pour votre support technique, administratif et émotionnel. Vous êtes rayonnantes et c'est un vrai plaisir de travailler avec vous !

Un grand merci également au **jeune Pierre**, sans qui le projet n'aurait pas pu être complété à temps. Merci infiniment pour ton aide, tu as été directement plongé dans le bain à ton arrivée il y a un an, et tu as réussi à t'approprier ton environnement de travail et gagner en autonomie et en confiance en toi. Je te félicite pour tous tes progrès, et je t'encourage d'ores et déjà pour la suite, en espérant que le *reviewing* sera clément !

Merci aux anciens, doctorants, post-doctorants, ingénieurs et néo-retraités, **Romain, Saadé, Marie-Noëlle** et **Jocelyne**, ça a été une belle expérience de travailler à vos côtés, à la fois enrichissante et divertissante !

Merci aux jeunes chercheurs qui ne sont restés qu'un court temps avec nous et que j'ai eu le plaisir d'accompagner, de près ou de loin, **Nicolas, Juliette** et **Manon**. J'ai beaucoup appris à vos côtés, scientifiquement comme humainement, et je vous remercie de m'avoir fait confiance tout le long de vos stages ! Vous avez de très belles carrières devant vous, et je vous souhaite qu'elles soient fun et pleines de réussites ! **Manon**, tu es la femme la plus rayonnante que je connaisse, et ton énergie et ta bonne humeur m'ont profondément touchée !

Merci à l'ensemble de l'équipe de **Sabine Colnot**, tout particulièrement à **Fanny, Razan, Camille** et **Gaëlle**, qui ont toujours été partantes pour un verre ou un karaoké ! Merci également à **Angélique** et **Christèle** pour leur merveilleux accueil lors de mon stage de Master 1, et à **Cécile** et **Julie** pour le temps qu'elles ont pris à m'instruire. Merci à vous toutes pour votre bienveillance et votre bonne humer (et aussi pour nous avoir sauvés plus d'une fois quand on était à court de produits !).

Merci également à **Hélène** et **Lucie** pour leur aide précieuse en matière de cytométrie.

Maintenant nous allons aborder les paragraphes remplis d'émotions et de déclarations pour la crème de la crème, donc les mouchoirs sont fortement recommandés.

Maëva, tu as été une inspiration tout au long de ma thèse. Ta résilience, ton énergie et ta force face à l'adversité tout au long de ta thèse ont suscité mon admiration, et je respecte beaucoup tout ce que tu as accompli. Merci pour tous tes encouragements et ton soutien, pour les duos sur *Careless Whisper* au karaoké, et tout simplement d'être une jeune femme merveilleuse et sincère. Je suis très fière de toi et de tout ce que tu as accompli, et tu nous manques beaucoup maintenant que tu es de l'autre côté de l'Atlantique. Une réunion à prévoir ASAP autour d'une poutine !

Flora, tu n'es pas partie aussi loin que Maëva, mais ton humour, ta gentillesse et ton énergie douce nous manquent tout autant ! Merci pour tous les bons moments que nous avons passés ensemble, pour les fous rires, les anecdotes de vie et les accidents mineurs qui ont

insufflé cette ambiance fraternelle que nous avons partagée entre étudiants. Tu as fait preuve de beaucoup de courage, de persévérance, de patience, et je suis heureuse pour toi maintenant que tu as trouvé ta voie !

Kimberley, merci pour ta bienveillance, ton calme olympien, ton dynamisme tranquille et tes analyses toujours très *on point* ! J'ai apprécié tous les moments passés avec toi, au labo et en dehors, et je suis confiante que tout le travail que tu as accompli va te mener vers une belle carrière !

Alice, nous n'avons pas véritablement collaboré, mais ce fut une belle rencontre que de t'avoir dans notre équipe ! Tu as été très impliquée dans ton stage et tout ton travail a porté ses fruits, puisque tu as décroché cette belle bourse de thèse au Luxembourg. Je te souhaite de garder ton bel esprit et ton sourire pour cette nouvelle aventure qui s'offre à toi !

Pierre l'ancien, fraîchement double-diplômé, bourreau de travail et des cœurs (professionnellement parlant, bien entendu, et je crois que c'est un zeugma). Nous avons fait nos débuts en même temps au labo, et petit à petit nous avons appris à nous connaître et à nous apprécier malgré les quelques différends que nous avons pu avoir. Merci pour tout ce que tu as fait pour le labo, merci pour ton aide, surtout à la fin, pour toutes les discussions, scientifiques ou non, que tu as partagé avec moi. Tu m'as énormément appris (beaucoup de vocabulaire !), et tu as été un modèle de rigueur et d'application, d'abnégation et de robustesse. Tu as laissé un souvenir indélébile au labo et dans nos esprits, tel un grand frère qu'on admire !

Irene, *cariñosa y sonriente, paciente y determinada, una mujer excepcional y una fuerza imparable ! Muchas gracias por tu apoyo, tu energía y tu bondad !* You radiate a calming energy, and it has been a pleasure to share the office with you. Thank you for all the good times that we've had, the Spanish lessons that I should practice more, and all the adventures that we have yet to experience !

Jing, you are an unstoppable force, always working and thinking, a passionate soul that loves life and everything it has to offer. Thank you for all the passionate talks that we've had, for giving me strength when I needed, for teaching me so many things about life, for sharing your passions and your interests, there is always a lot to learn from you ! You truly are a star, and I'm looking forward to visiting China with you !

Qi Yuan, thank you for always being positive and smiling, you have a great energy and I hope this French experience will create great moments and countless memories ! Thank you for all the snacks, they always brighten and spice up the mood !

Joana, je ne sais même pas par où commencer tellement il y a de choses à dire ! Tu es la personne avec laquelle j'ai le plus travaillé, nos méninges combinées ont réussi à faire des choses extraordinaires que je n'aurais pas pu faire sans toi. Par bien des aspects on se ressemble, et cela a fait notre force tous les jours, jusqu'à devenir presque surnaturel lorsqu'on pensait à la même chose au même moment, où qu'on s'habillait pareil le matin. Grâce à nos différences, nous avons pu nous soutenir mutuellement à travers les difficultés dans nos projets, et sans toi il y aurait eu beaucoup de larmes et de nerfs. Tu es lumineuse, courageuse, tu as une détermination sans faille et une passion pour le travail bien fait qui ne peuvent te porter que vers le haut ! Merci pour tout, pour les *pep talks*, pour les descentes contrôlées vers la folie, les fous rires, les mots gentils, les moments girly, les moments *Slipknot* et *System of a Down*, les discussions de pointe sur les manips et les projets. Merci pour ton sourire radieux ! Tu as été et tu es encore une inspiration, un modèle, un phare dans la tempête, et je te suis à jamais reconnaissante pour tous les moments que nous avons passés ensemble !

Christelle, sur qui je peux compter plus que sur moi-même, surtout quand il s'agit d'aller manger ! Tout comme avec Pierre, nous avons commencé en même temps (trois, triangle, Illuminati ???), cependant on s'est très vite bien entendues et avons cultivé cette tradition d'aller au restaurant tous les vendredis durant notre Master 2. On s'est comprises sur bien des aspects entre personnes sensibles, et c'est ce qui fait ta grande force dans ce monde de brutes. Tu fais attention à tous, tu as un sourire époustouflant qui repousse n'importe quelle morosité, tu es pleine d'énergie et de ressources, et tu ne te laisses pas abattre par les obstacles, quels qu'ils soient ! Merci pour tout ton soutien, ta bonne humeur, ton aide précieuse, et pour tous les bons moments qu'on a passé en dehors du labo, surtout quand il s'agit d'aller se faire torturer en cours de zumba ! Et je compte sur toi pour me suivre dans mes prochaines vacances ou ma future nouvelle lubie sportive !

À ma famille, merci pour votre amour et votre soutien à travers cette aventure ! Merci à **mes parents** pour tout, vous avez subi de nombreuses épreuves, et malgré tout vous avez réussi à naviguer jusqu'à aujourd'hui avec brio pour Dominique et moi. Merci d'être venus

en France, c'était une décision très dure à prendre, cela a demandé beaucoup de sacrifices et d'organisation, mais ainsi vous m'avez offert l'opportunité de pouvoir accomplir plus que ce que j'aurais pu faire en Roumanie, et je vous serai éternellement reconnaissante pour ça ! Merci à mon cher frère, **Dominique**, qui est devenu un jeune homme formidable, courageux et brillant, pour ton esprit cinglant mais extrêmement drôle. Merci pour ton soutien, même si je ne suis pas souvent passée à la maison, à chaque fois j'ai pris un immense plaisir à me fendre la poire avec toi ! Je vous aime du fond du cœur !

Et enfin, j'aimerais dédier ce dernier paragraphe à la mémoire de ceux qui ne sont plus parmi nous. Tout d'abord à ma grand-mère, **Paraschiva Matei**, qui nous a quittés avant d'avoir pu voir ses petits-enfants voler de leurs propres ailes, mais qui a été un pilier de la famille et qui sera à jamais dans nos cœurs. Et à mes cochons d'Inde, **Panzou** et **Ronnie**, qui malgré leur petite taille ont rempli mon cœur de bonheur pendant ma thèse.

AVANT-PROPOS

L'émergence des maladies stéatosiques non-alcooliques du foie en tant que nouvelle épidémie mondiale suscite un grand intérêt non seulement en matière de recherche fondamentale, mais également en recherche thérapeutique. Ces pathologies se développent sous la forme d'une séquence, avec tout d'abord une accumulation de lipides au niveau hépatique, appelée stéatose, évoluant vers une forme inflammatoire sévère, la stéatohépatite, qui peut donner lieu à une dégénérescence du tissu vers une cirrhose, ou favoriser les événements mutationnels conduisant au développement d'un cancer. Le carcinome hépatocellulaire étant la troisième cause de mortalité par cancer au niveau mondial, avec des solutions thérapeutiques extrêmement limitées et peu efficaces, il est nécessaire de comprendre les mécanismes promouvant son développement. Ainsi, il serait possible de réduire la probabilité de développer ce type de cancer, mais également d'améliorer la qualité de vie des patients dans les étapes précoces de la pathologie. Bien que souvent les interventions diététiques et la mise en place d'une hygiène de vie plus saine soient suffisantes, certains patients présentant un stade avancé ont besoin d'autres solutions thérapeutiques. Toutefois, la complexité inhérente à ces pathologies, qui présentent à la fois des dérégulations métaboliques et immunitaires, rend difficile la recherche de thérapies médicamenteuses. Plusieurs molécules sont à l'essai, mais aucune mise sur le marché n'a vu le jour ces dernières années.

Ces travaux de thèse s'inscrivent donc dans le cadre de ces pathologies, et visent à comprendre le fonctionnement de *leucocyte cell-derived chemotaxin 2* (LECT2), une petite molécule de 16 kDa sécrétée par les hépatocytes intervenant dans la régulation du métabolisme et de l'inflammation. Le laboratoire étudie LECT2 depuis plusieurs années, dans le cadre de la tumorigénèse provoquée par des mutations activatrices de la β -caténine. Nous avons mis en évidence que LECT2 était essentiel pour la mise en place d'une réponse inflammatoire efficace à travers ses effets sur les cellules NKT et les macrophages, empêchant la perte de différenciation des hépatocytes et la propagation de métastases ([Anson et al., 2012](#); [L'Hermitte et al., 2019](#)). Par la suite, Sandrine Pham a démontré au cours de son doctorat le rôle de LECT2 dans la régulation de la lipogenèse et son lien avec le métabolisme du cholestérol dans des conditions physiologiques. À mon arrivée en tant que stagiaire de Master 2 aspirant à poursuivre un doctorat, j'ai pris la suite de ce projet, sous la direction du Professeur Jean-Pierre Couty, afin d'explorer le comportement de LECT2 dans

les pathologies stéatosiques non-alcooliques du foie. Initialement, les résultats obtenus ont donné au projet un aspect plutôt immunitaire, mais très rapidement des pistes métaboliques se sont imposées, et constituent la plus grande partie de la publication qui résulte de ces travaux. De plus, nous avons jugé pertinent de combiner les résultats de Sandrine et les miens dans une seule et même publication afin de faciliter la compréhension de notre message scientifique, et nous partageons la place de première auteure sur cette publication.

Ce manuscrit décrit en trois chapitres le fonctionnement métabolique du foie, les altérations immunométaboliques conduisant à la mise en place des maladies stéatosiques non-alcooliques du foie, et les connaissances bibliographiques quasi-exhaustives à propos de LECT2. Cette introduction est suivie des résultats sous forme d'un article scientifique en anglais, ainsi que d'une discussion permettant de revenir sur certains points clés de mes travaux et d'exposer les perspectives que j'envisage pour la suite de ce projet.

Malgré le contenu très métabolique de mon travail, ma spécialité initiale est l'immunologie. J'ai eu l'occasion de mettre mes connaissances à contribution dans plusieurs autres projets du laboratoire qui font l'objet de thèses en cours. J'ai également eu l'honneur de participer à la révision des travaux de Mathilde Cadoux publiés en 2021 dans *Journal of Hepatology*, qui seront inclus en annexe de ce manuscrit.

Expression of NKG2D ligands is downregulated by β -catenin signalling and associates with HCC aggressiveness. Mathilde Cadoux, Stefano Caruso, Sandrine Pham, Angélique Gougelet, Céline Pophillat, Rozenn Riou, Robin Loesch, Sabine Colnot, Côm Trung Nguyen, Julien Calderaro, Séverine Celton-Morizur, Nadia Guerra, Jessica Zucman-Rossi, Chantal Desdouets, Jean-Pierre Couty. *Journal of Hepatology*. 2021 Jun;74(6):1386-1397. doi: 10.1016/j.jhep.2021.01.017. Epub 2021 Jan 21. PMID: 33484773.

SOMMAIRE

RÉSUMÉ	3
ABSTRACT.....	4
REMERCIEMENTS	7
AVANT-PROPOS	13
SOMMAIRE	15
TABLE DES FIGURES	20
ABRÉVIATIONS.....	22
INTRODUCTION	27
CHAPITRE I : LE FOIE EN TANT QU'ORGANE CENTRAL DU MÉTABOLISME...	29
I. Structure et fonctions du foie	29
II. Homéostasie énergétique.....	31
A) Métabolisme du glucose	31
1. <i>Absorption du glucose</i>	31
2. <i>Glycolyse</i>	32
3. <i>Synthèse du glycogène</i>	32
4. <i>Voie des pentoses phosphate</i>	32
5. <i>Glycogénolyse et néoglucogenèse</i>	33
a. À partir d'acides gras.....	34
b. À partir de lactate	34
c. À partir d'acides aminés.....	35
B) Métabolisme des acides gras.....	36
1. <i>Structure des acides gras</i>	36
2. <i>Transformation des acides gras</i>	37
a. Acides gras provenant de la digestion.....	37
b. Acides gras issus de la lipolyse du tissu adipeux.....	37
c. Lipogenèse <i>de novo</i>	37
3. <i>Synthèse des TAG et sécrétion des VLDL</i>	39
4. <i>Acides gras comme source d'énergie</i>	40
a. β -oxydation	40
b. Cétogenèse.....	41

c.	Cycle de Krebs	42
C)	Métabolisme du cholestérol	43
1.	<i>Absorption du cholestérol</i>	43
2.	<i>Synthèse du cholestérol</i>	44
3.	<i>Oxystérols</i>	45
4.	<i>Export et recyclage du cholestérol</i>	46
5.	<i>Synthèse et excrétion des acides biliaires</i>	47
6.	<i>Autres voies de régulation de l'homéostasie du cholestérol</i>	48
III.	Interconnexion des voies de régulation	49
A)	Signalisation insulino-dépendante	50
B)	Facteurs de transcription SREBP	50
1.	<i>Clivage protéolytique</i>	51
2.	<i>Régulation de l'activité de SREBP1c par l'insuline</i>	52
3.	<i>Régulation de SREBP2 par le cholestérol</i>	53
4.	<i>Régulation transcriptionnelle de SREBP1c par LXR</i>	54
C)	Facteur de transcription ChREBP	54
1.	<i>Régulation transcriptionnelle de ChREBP par la glucokinase</i>	55
2.	<i>Régulation transcriptionnelle de ChREBP par LXR</i>	55
3.	<i>Régulation de l'activité de ChREBP</i>	55
D)	Récepteur nucléaire LXR	56
1.	<i>Régulation de LXR</i>	57
2.	<i>Régulation de la lipogenèse via SREBP1c</i>	58
3.	<i>Régulation du métabolisme du cholestérol</i>	59
CHAPITRE II : LES MALADIES STÉATOSIQUES NON-ALCOOLIQUES DU FOIE. 61		
I.	Les NAFLD : une épidémie moderne	61
A)	Épidémiologie	61
B)	Comorbidités	62
C)	Progression pathologique	62
II.	Développement de la stéatose hépatique	64
A)	Adaptation du foie face à une surcharge d'acides gras	64
1.	<i>Stockage sous forme de gouttelettes lipidiques</i>	64
2.	<i>Sécrétion via les VLDL</i>	65
3.	<i>Lipogenèse de novo</i>	66
4.	<i>Oxydation des acides gras</i>	66

B)	Développement de l'insulinorésistance	67
1.	<i>Insulinorésistance du tissu adipeux</i>	67
2.	<i>Insulinorésistance du foie</i>	68
3.	<i>Stéatose et insulinorésistance</i>	70
4.	<i>Insulinorésistance et stress du réticulum endoplasmique</i>	71
5.	<i>Insulinorésistance et inflammation</i>	73
C)	Réponse du foie : les hépatokines	73
1.	<i>Fibroblast growth factor 21</i>	74
2.	<i>Fétuine A</i>	75
III.	Installation et progression de la NASH	76
A)	Lipotoxicité	76
1.	<i>Espèces lipotoxiques</i>	77
2.	<i>Lipotoxicité et stress du réticulum endoplasmique</i>	78
3.	<i>Stress oxydatif et altération de la fonction mitochondriale</i>	78
B)	Inflammation	80
1.	<i>Récepteurs de l'immunité innée</i>	80
a.	TLRs	80
b.	NLRP3	81
2.	<i>Effecteurs cellulaires</i>	83
a.	Cellules de Kupffer	83
b.	Cellules <i>natural killer</i>	85
c.	NKT	85
d.	Lymphocytes T	86
3.	<i>Inflammation du tissu adipeux</i>	88
C)	Axe entéro-hépatique	88
D)	LXR et lipotoxicité hépatique	90
1.	<i>Contenu en acides gras</i>	90
2.	<i>Homéostasie du cholestérol dans l'hépatocyte</i>	91
3.	<i>Implication dans la réponse inflammatoire</i>	91
IV.	Vers l'émergence du carcinome hépatocellulaire	92
A)	La fibrose hépatique	93
1.	<i>Inflammation et développement de fibrose</i>	93
2.	<i>Cirrhose</i>	94
B)	Le carcinome hépatocellulaire	94

V. Solutions thérapeutiques pour les NAFLD	96
CHAPITRE III : LECT2, UNE NOUVELLE HÉPATOKINE	99
I. Caractéristiques de LECT2	99
A) Structure.....	99
B) Expression de <i>Lect2</i>	100
C) Récepteurs de LECT2	101
1. <i>DC-SIGN / CD209a</i>	101
2. <i>VEGFR2</i>	102
3. <i>cMET</i>	102
4. <i>Tie1/Tie2</i>	103
II. Fonctions de LECT2 dans l'organisme	104
A) Rôle dans le métabolisme	104
1. <i>Dyslipidémie et syndrome métabolique</i>	104
2. <i>Résistance à l'insuline</i>	105
3. <i>Athérosclérose</i>	105
B) Fonctions immunitaires	106
1. <i>Régulation de l'inflammation</i>	106
2. <i>Homéostasie des NKT</i>	107
3. <i>Rôle dans le CHC et autres cancers</i>	107
C) Rôle dans la fibrose hépatique	108
RÉSULTATS	109
OBJECTIFS	111
ARTICLE SCIENTIFIQUE	113
DISCUSSION	177
I. LECT2 et régulation de la voie LXR	179
A) Lien entre LECT2, lipogenèse et oxydation des acides gras	179
B) LECT2, LXR et oxystérols	181
C) Voie(s) de signalisation de LECT2.....	182
II. Expression de LECT2 dans les NAFLD	183
A) LECT2 et résistance à l'insuline.....	183
B) LECT2 et régulation du métabolisme du cholestérol.....	184
C) LECT2 et fonction mitochondriale.....	186
D) LECT2 et lipotoxicité.....	187

E) LECT2 et inflammation	188
F) LECT2 et tumorigénèse hépatique.....	190
III. LECT2 en tant que biomarqueur pour les NAFLD	191
IV. Conclusion.....	192
ANNEXE.....	235

TABLE DES FIGURES

Figure 1. Anatomie du foie humain et murin.....	29
Figure 2. Organisation structurelle du lobule hépatique, l'unité fonctionnelle du foie	30
Figure 3. Régulation du métabolisme hépatique du glucose.....	33
Figure 4. Néoglucogenèse à partir de plusieurs substrats	35
Figure 5. Flux d'acides gras vers et depuis le foie.....	40
Figure 6. Production d'énergie par l'oxydation des acides gras	41
Figure 7. Synthèse d'ATP grâce au cycle de Krebs	43
Figure 8. Les différents oxystérols synthétisés par le foie.....	45
Figure 9. Recyclage du cholestérol depuis les organes vers le foie via les HDL	47
Figure 10. Voie PI3K induite par l'insuline	50
Figure 11. Complexe de régulation des SREBP dans la membrane du RE	52
Figure 12. Principales voies de régulation de ChREBP	56
Figure 13. Mécanisme d'activation de LXR.....	57
Figure 14. LXR régule le métabolisme des lipides et du cholestérol	60
Figure 15. Les différents stades des NAFLD avec différents facteurs causaux	63
Figure 16. Histologie de la stéatose hépatique	65
Figure 17. Cascade de signalisation de l'UPR	72
Figure 18. Les hépatokines permettent la régulation des organes métaboliques.....	74
Figure 19. Les mécanismes de la lipotoxicité.....	79
Figure 20. Activation de NFκB par les voies canonique et non-canonique	81
Figure 21. Activation de l'inflammasome NLRP3	82
Figure 22. Effecteurs myéloïdes de l'inflammation hépatique.....	85
Figure 23. Perturbations métaboliques et conséquences sur l'activation du système immunitaire.....	87
Figure 24. Régulation du métabolisme hépatique par FXR.....	90
Figure 25. Mécanismes anti-inflammatoires de LXR.....	92

Figure 26. Mécanismes d'induction de la fibrose au cours de la NASH.....	94
Figure 27. Principales voies de développement du CHC dans les NAFLD	96
Figure 28. Le ciblage des voies métaboliques peut constituer une solution thérapeutique au cours des NAFLD	98
Figure 29. Structure tertiaire de LECT2.....	100
Figure 30. Territoire d'expression de LECT2 dans le parenchyme hépatique.....	101
Figure 31. LECT2 réduit l'angiogenèse en empêchant la signalisation d'HGF sur cMET	103
Figure 32. L'interaction LECT2/Tie1 provoque la fibrose hépatique	104
Figure 33. LECT2 participe à l'homéostasie de l'export des acides biliaires sous HFD.....	185
Figure 34. Mécanisme proposé pour la régulation de la synthèse du cholestérol par Nfe2L1.	185
Figure 35. Quantification du cholestérol libre et estérifié dans les foies de souris contrôle et LECT2 ^{-/-} après 6 mois de régime HFHC.....	188
Figure 36. La délétion de Lect2 altère la réponse inflammatoire dans les étapes précoces de la NASH provoquée par une surcharge en cholestérol.	190

ABRÉVIATIONS

~ A ~

ABC : *ATP binding cassette superfamily*
ACAT : acétyl-CoA acétyltransférase
ACC : acétyl-CoA carboxylase
ACSL : *long chain acyl-CoA synthetase*
AGPAT : acylglycérol-3-phosphate acyl-transférase
AHSG : *α2-Heremans-Schmid glycoprotein*
ALK1 : *activin receptor-like kinase 1*
AMP : adénosine monophosphate
AMPK : *AMP-activated protein kinase*
APC : *adenomatous polyposis coli*
ARE : *antioxydant response elements*
ASAT : aspartate aminotransférase
ASC2 : *activating signal co-integrator 2*
ATF6 : *activating transcription factor 6*
ATGL : *adipose triglyceride lipase*
ATP : adénosine triphosphate

~ B ~

BHBDH : beta-hydroxybutyrate déshydrogénase
bHLHLZ : *basic-helix-loop-helix-leucine zipper*
BI1 : *Bax inhibitor 1*
BMDM : *bone marrow-derived macrophage*
BMP9/10 : *bone morphogenetic protein 9/10*

~ C ~

CACT : carnitine-acyl-carnitine transférase
CCL2/5 : *C-C motif chemokine ligand 2/5*
CDAA : *choline deficient/ amino acid defined*
C/EBPβ : *CCAAT/enhancer-binding protein β*

Ch25H : cholestérol 25-hydroxylase
CHC : carcinome hépatocellulaire
ChoRE : *carbohydrate response element*
ChREBP : *carbohydrate response element binding protein*
cMET : *cellular mesenchymal-epithelial transition*
CoA : coenzyme A
CPT : carnitine/palmitoyl-transférase
CSF1 : *colony-stimulating factor 1*
CXCR6 : *C-X-C motif chemokine receptor 6*
CYP7A1 : cytochrome P450 7α-hydroxylase

~ D ~

DAG : diacylglycérol
DAMP : *danger-associated molecular pattern*
DC-SIGN : *dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3 grabbing non-integrin*
DEN : diéthylnitrosamine
DGAT : DAG acyl-transférase
DHAP : dihydroxyacétone phosphate
DLL4 : *delta-like canonical NOTCH ligand 4*

~ E ~

ELOVL : *elongation of very long chain fatty acids*
ERAD : *ER-associated degradation*
ERC : *endocytic recycling compartments*
ERK : *extracellular signal-regulated kinase*

~ F ~

F6P : fructose-6-phosphate
F1,6BP : fructose-1,6-biphosphate

FADH₂ : flavine adénine dinucléotide réduit

FABP : *fatty acid binding protein*

FAS : *fatty acid synthase*

FATP : *fatty acid transport protein*

FGF21 : *fibroblast growth factor 21*

FIT2 : *fat storage-inducing transmembrane protein 2*

FOXO1 : *Forkhead box protein O1*

FXR : *farnesoid X receptor*

~ G ~

G1P : glucose-1-phosphate

G3P : glyceraldéhyde-3-phosphate

G6P : glucose-6-phosphate

G6Pase : G6P phosphatase

GAPDH : glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase

GCK : glucokinase

GKRP : *glucokinase regulatory protein*

GLUT2 : *glucose transporter type 2*

GOT2 : glutamate-oxaloacétate transaminase 2

mGPAT : G3P acyltransférase mitochondriale

GPD : glycérol-3-phosphate déshydrogénase

GRACE : *glucose response activation conserved element*

GRP78 : *glucose-regulated protein 78*

GSH : glutathion réduit

GSK3 : glycogène synthase kinase 3

GSSG : glutathion oxydé

GYS : glycogène synthase

~ H ~

HDL : *high density lipoprotein*

HFD : *high fat diet*

HFHC : *high fat high cholesterol*

HGF : *hepatocyte growth factor*

HMG : 3-hydroxyl-3-méthylglutaryl

HMGCL : HMG-CoA lyase

HMGCR : HMG-CoA réductase

HMGCS : HMG-CoA synthase

HO1 : hème oxygénase

HOMA-IR : *homeostatic model assessment of insulin resistance*

HSC : *hepatic stellate cells*

HSL : *hormone-sensitive lipase*

~ I ~

ICAM : *inter-cellular adhesion molecule*

ID3 : *inhibitor of differentiation 3*

IDOL : *inducible degrader of the LDL receptor*

IFN γ : interféron γ

IL : interleukine

iNKT : *invariant NKT cell*

INSIG : *insulin-induced gene*

IR : récepteur à l'insuline

IRE1 : *inositol-requiring enzyme 1*

IRS : insulin receptor substrate

~ J ~

JNK1 : *c-jun NH2-terminal kinase 1*

~ K ~

KC : cellule de Kupffer

KEAP1 : *Kelch-like ECH-associated protein 1*

~ L ~

LAM : *lipid-associated macrophage*

LDH : lactate déshydrogénase

LDL : *low density lipoprotein*

LECT2 : *leucocyte cell-derived chemotaxin 2*

LEF : *lymphoid enhancer-binding factor*

LFA1 : *lymphocyte function-associated antigen*

LID : *low-glucose inhibitory domain*

LIRKO : *liver insulin receptor knock-out*

LPCAT3 : *lysophosphatidylcholine acyltransferase 3*

LPL : *lipoprotéine lipase*

LRP : *LDL receptor-related protein*

LSEC : *liver sinusoidal endothelial cells*

LXR : *liver X receptor*

~ M ~

MAG : *monoacylglycérol*

MARCH6 : *membrane-associated ring-CH-type finger 6*

MCD : *methionine and choline deficient high fat diet*

MCT1 : *monocarboxylate transporter 1*

MDH : *malate déshydrogénase*

MLX : *Max-like protein X*

moKC : *monocyte-derived KC*

mTORC1 : *mammalian target of rapamycin complex 1*

MTTP : *microsomal triglyceride transfer protein*

MUFA : *mono-unsaturated fatty acid*

Myd88 : *myeloid differentiation factor 88*

~ N ~

NAD⁺ : *nicotinamide adénine dinucléotide oxydé*

NADH, H⁺ : *nicotinamide adénine dinucléotide réduit*

NADP⁺ : *nicotinamide adénine dinucléotide phosphate oxydé*

NADPH : *nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit*

NAFL : *non-alcoholic fatty liver*

NAFLD : *non-alcoholic fatty liver diseases*

NASH : *non-alcoholic steatohepatitis*

NCoR : *nuclear receptor co-repressor*

NEFA : *non-esterified fatty acid*

NES : *nuclear export signal*

NFE2L1/2 : *nuclear factor erythroid 2 related factor-1 et -2*

NFκB : *nuclear factor κ B*

NK : *natural killer cell*

NKT : *natural killer T cell*

NLRP3 : *nucleotide oligomerization domain-containing protein (NOD), LRR- and pyrin domain-containing protein 3*

NLS : *nuclear localization signal*

NOS : *nitric oxide synthase*

NPC1L1 : *Niemann-Pick type C1-like 1*

~ O ~

OHC : *hydroxycholestérol*

~ P ~

PAMP : *pathogen-associated molecular pattern*

PCSK9 : *proprotein convertase subtilisin-kexin type 9*

PD1 : *programmed cell death 1*

PDK1 : *pyruvate déshydrogénase kinase 1*

PEP : *phosphoénolpyruvate*

PEPCK : *phosphoénolpyruvate carboxykinase*

PERK : *PKR-like ER kinase*

PFK : *phosphofructokinase*

PGM : *phosphoglucomutase*

PHI : *phosphohexose isomérase*

PI3K : *phosphatidylinositol 3 kinase*

PIP2 : *phosphatidylinositol 4,5-biphosphate*

PIP3 : *phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate*

PK : *pyruvate kinase*

PKA : *protéine kinase A*

PKC ϵ/ζ : protéine kinase C ϵ/ζ
PLIN : périlipine
PP2A : protéine phosphatase 2A
PPAR α : *peroxysome proliferator-activated receptor α*
PTEN : *phosphatase and tensin homolog*
PUFA : *poly-unsaturated fatty acid*
PYGL : glycogène phosphorylase

~ R ~

RE : réticulum endoplasmique
RIDD : *regulated IRE1 α -dependent decay*
RNF : *RING finger protein*
ROS : *reactive oxygen species*
RXR : *retinoid X receptor*

~ S ~

S1/2P : *site1/2 protease*
SAR1 : *secretion-associated RAS superfamily 1*
SCAP : *SREBP cleavage-activating protein*
SCD1 : stéaroyl-CoA décarboxylase
SERCA : *sarco/endoplasmic reticulum calcium ATPase*
SFA : *saturated fatty acids*
SHP : *small heterodimer protein*
SMRT : *silencing mediator of retinoic acid and thyroid hormone receptor*
SQLE : squalène epoxydase
SRE : *sterol response element*
SREBP : *sterol regulatory element-binding protein*
SSD : *sterol sensing domain*
STAT1/3 : *signal transducer and activator of transcription 1/3*

~ T ~

TAG : triacylglycérol
TCF : *T cell factor*

Tie : *tyrosine kinase with immunoglobulin-like and EGF like domains*

TIM4 : *T-cell immunoglobulin and mucin domain containing 4*

TLR : *Toll-like receptor*

TM6SF2 : *transmembrane 6 superfamily 2*

TNF α : *tumor necrosis factor α*

Treg : *T regulatory cell*

~ U ~

UBC7P : *ubiquitin-conjugating protein 7*

UBE2J2 : *ubiquitin-conjugating enzyme 2 J2*

UDP : *uridine diphosphate*

UGPP : *UDP-glucose pyrophosphorylase*

UPR : *unfolded protein response*

~ V ~

VCAM : *vascular cell adhesion molecule*

VCP : *valosin-containing protein*

VEGFR2 : *vascular endothelial growth factor receptor 2*

VLDL : *very low density lipoproteins*

VTV : *VLDL transfer vesicle*

~ X ~

XBP1 : *X-box protein 1*

INTRODUCTION

CHAPITRE I : LE FOIE EN TANT QU'ORGANE CENTRAL DU MÉTABOLISME

I. Structure et fonctions du foie

Le foie est un organe central dans les différents processus métaboliques de l'organisme. Il fait partie du système digestif et est localisé dans la partie supérieure de l'abdomen, en dessous du diaphragme. C'est un organe présent chez tous les vertébrés et présente une structure conservée au cours de l'évolution. Chez l'Homme, le foie présente deux lobes, le droit et le gauche, tandis que celui de la souris en compte 4 : le gauche, le droit, le médian et le caudé (*Kruepunga et al., 2019*).

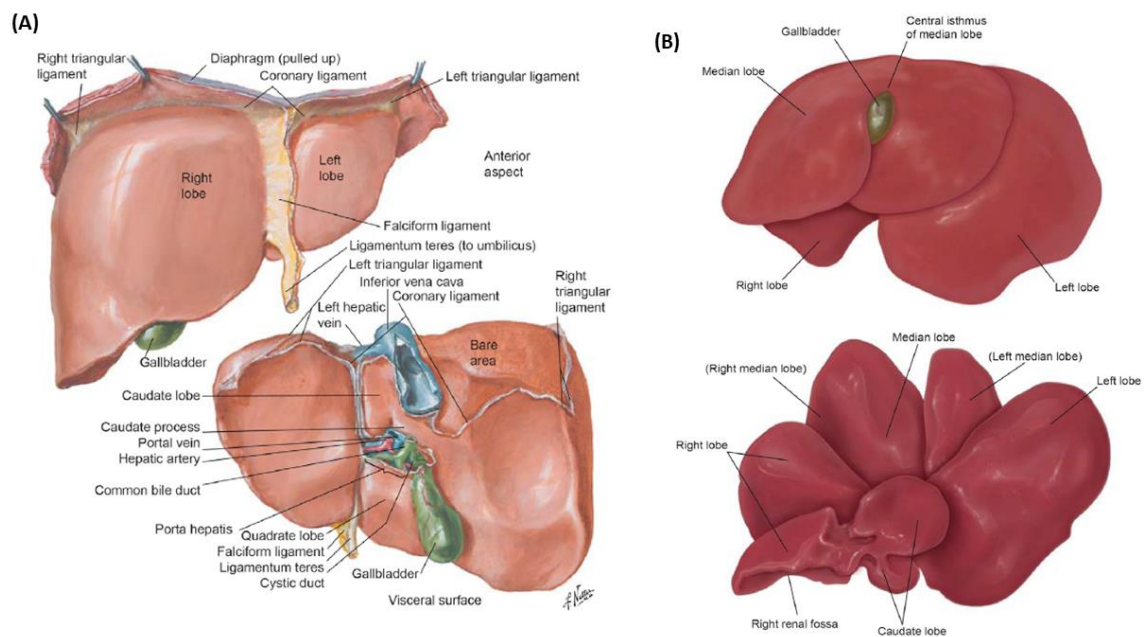


Figure 1. Anatomie du foie humain et murin

(A) Le foie et la vésicule biliaire chez l'Homme. (B) Le foie et la vésicule biliaire chez la souris. Adapté de *Rogers and Dintzis, 2018*.

Le parenchyme hépatique est constitué de plusieurs types cellulaires organisés sous forme de lobules ou acini, définissant ainsi l'unité fonctionnelle du foie. Schématiquement, les lobules ont une forme hexagonale, avec à chaque sommet un espace porte, et au centre de l'hexagone une veine centro-lobulaire constituant l'espace périveineux (*Abdel-Misih and Bloomston, 2010*). Les espaces porte comportent un canal biliaire, une veinule porte et une artériole hépatique. Les hépatocytes sont organisés en travées irradiant de la veine centro-

lobulaire vers les espaces porte. Entre deux rangées d'hépatocytes, les cellules endothéliales du foie, ou *liver sinusoid endothelial cells* (LSEC), délimitent les capillaires hépatiques, les sinusoides. On distingue également les canalicules biliaires qui acheminent les acides biliaires sécrétés par les hépatocytes vers les canaux biliaires des espaces porte, dans le sens inverse de la circulation sanguine. Ces canalicules sont délimités par les cholangiocytes. Le parenchyme hépatique contient également de nombreuses cellules immunitaires, puisque le foie est un site immunologique très particulier. Ces propriétés seront développées dans le **Chapitre II**.

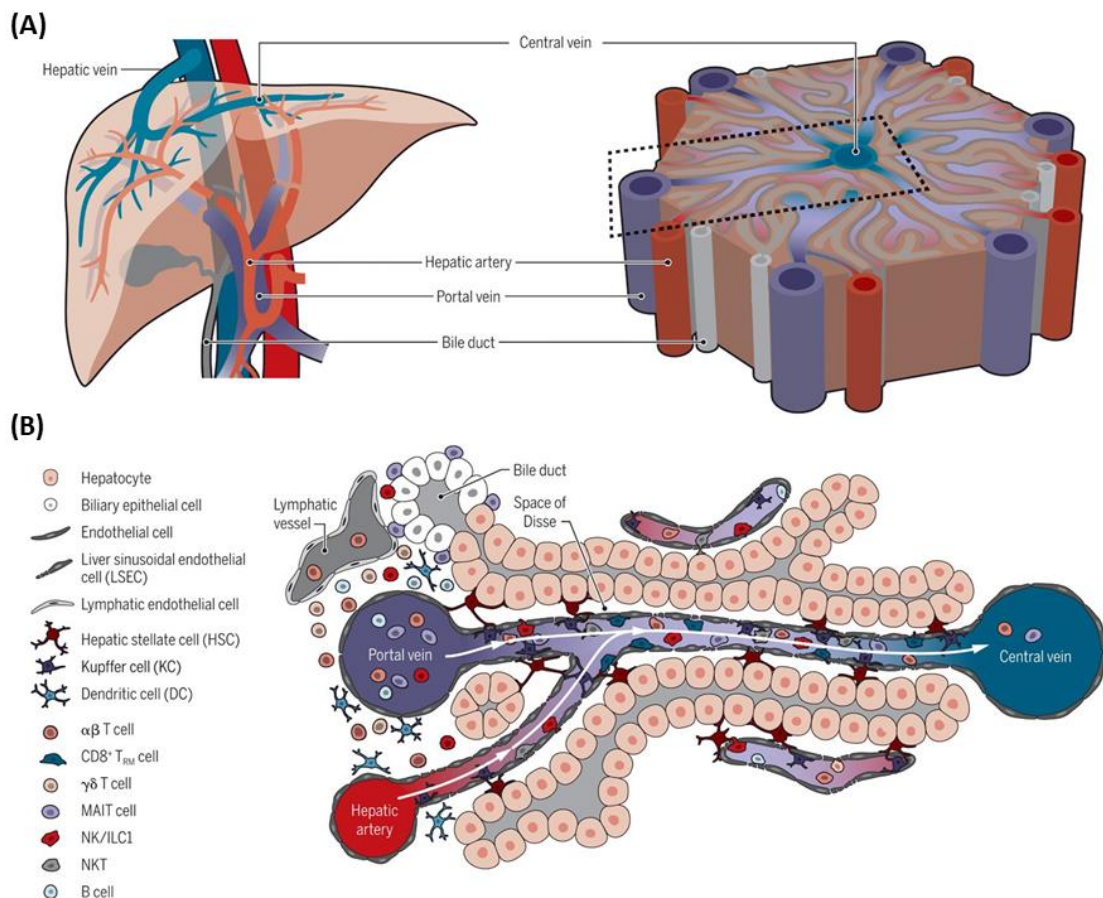


Figure 2. Organisation structurelle du lobule hépatique, l'unité fonctionnelle du foie

(A) Projection des principaux vaisseaux sur l'unité fonctionnelle du foie, à savoir le lobule hépatique. On distingue la veine centro-lobulaire (central vein), et les espaces portes constitués d'une artère hépatique (hepatic artery), d'une veine porte (portal vein) et d'un canal biliaire (bile duct). (B) Structure des travées d'hépatocytes selon l'axe porto-central avec les différents types cellulaires constituant le lobule. Le sang arrive par l'espace porte et irrigue le lobule par les sinusoides jusqu'à la veine centro-lobulaire. Adapté de Ficht and Iannacone, 2020.

La circulation hépatique est très particulière, puisque l'irrigation est à double entrée. Le sang riche en nutriments et hormones provenant de l'intestin et du pancréas via la veine porte constitue 80% de l'afflux pénétrant dans le foie. Les 20% restants, riches en oxygène,

proviennent de la circulation artérielle (*Vollmar and Menger, 2009*). Se met alors en place un gradient de nutriments et d'oxygène entre les espaces porte et périveineux qui définit la zonation métabolique du foie. En effet, les hépatocytes présentent une spécialisation fonctionnelle différente selon leur position sur l'axe porto-veineux. Ceux de la zone péri-portale sont plus impliqués dans le métabolisme des acides gras via la β -oxydation, la néoglucogenèse et la synthèse de cholestérol, tandis que ceux proches de la veine centrolobulaire utilisent le glucose via la glycolyse ou le stockent sous forme de glycogène, et participent à la lipogenèse et la cétogenèse (*Jungermann and Katz, 1989*).

II. Homéostasie énergétique

A) Métabolisme du glucose

Le glucose est la source d'énergie principale de la majorité des types cellulaires de l'organisme. Sa disponibilité est régulée par l'insuline et le glucagon, responsables respectivement du stockage sous forme de glycogène, et de la libération du glucose dans le sang. Le foie étant le principal régulateur de l'homéostasie énergétique de l'organisme, il possède des mécanismes tels que la glycogénogenèse et la néoglucogenèse pour assurer une disponibilité optimale du glucose.

1. Absorption du glucose

Arrivé des intestins via la circulation portale, le glucose est absorbé au niveau du foie par les hépatocytes via le récepteur GLUT2, dont l'affinité pour le glucose est faible et ne dépend pas de l'insuline (*Bechmann et al., 2012*). Il est ensuite phosphorylé en glucose-6-phosphate (G6P) par la glucokinase hépatique (GCK) et peut alors être utilisé directement via la glycolyse, ou être mis en réserve sous forme de glycogène. Il est important de noter que la GCK est l'enzyme limitante de la conversion du glucose, et son activité est finement régulée de manière insulino-dépendante. En effet, le principal inhibiteur de son activité est la *glucokinase regulatory protein* (GKRP), qui permet la séquestration de la GCK dans le noyau de l'hépatocyte lorsque la concentration en glucose est faible (*Raimondo et al., 2015*). L'association et la dissociation du complexe GCK-GKRP sont contrôlées par le glucagon et l'insuline respectivement (*Petersen et al., 2017*). De plus, l'expression du gène *Gck* est également sous le contrôle de l'insuline et du glucagon (*Agius, 2008*).

2. Glycolyse

Lorsque l'hépatocyte a besoin d'utiliser le glucose pour produire de l'énergie, le G6P rejoint la voie de la glycolyse. Il sera alors converti en fructose-6-phosphate (F6P) par la phosphohexose isomérase, puis en fructose-1,6-biphosphate (F1,6BP) par la phosphofruktokinase (PFK). L'aldolase clive le F1,6BP en deux molécules comportant chacune 3 carbones, le glyceraldéhyde-3-phosphate (G3P) et le dihydroxyacétone phosphate (DHAP). Ce dernier est isomérisé en G3P par la triose phosphate isomérase, conduisant après quelques réactions à du phosphoénolpyruvate (PEP) puis à du pyruvate produit par la pyruvate kinase (PK).

La GCK et la PFK consomment chacune une molécule d'ATP, et 4 ATP et 2 nicotinamides dinucléotides réduits (NADH, H⁺) sont générés par la glycolyse, soit un total de 2 ATP et 2 NADH, H⁺ produits par molécule de glucose. Enfin, le pyruvate peut être utilisé par la mitochondrie pour générer de l'acétyl-CoA pouvant rejoindre le cycle de Krebs, ou initier la lipogenèse *de novo* (Bechmann et al., 2012; Litwack, 2018a).

3. Synthèse du glycogène

Dans des conditions post-prandiales, où la concentration en glucose est équivalente entre le sang et l'hépatocyte, le G6P est converti en glucose-1-phosphate par la phosphoglucomutase (PGM) puis en uridine diphosphate (UDP)-glucose par l'UDP-glucose pyrophosphorylase (UGPP). La glycogène synthase (GYS) va alors incorporer l'UDP-glucose dans une chaîne de glycogène. Cette enzyme est inactive sous forme phosphorylée, elle est inactivée par la glycogène synthase kinase 3 (GSK3) qui est une cible de la signalisation Akt/PI3K dépendante de l'insuline. L'AMP-activated protein kinase (AMPK) et la protéine kinase A (PKA) sont aussi des inhibiteurs de la GYS. L'insuline stimule la glycogénogenèse en réprimant la PKA (Bechmann et al., 2012).

4. Voie des pentoses phosphate

Le G6P peut également être utilisé pour la synthèse de ribose-5-phosphate nécessaire pour produire des nucléotides dans les cellules en prolifération, et pour générer du nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit (NADPH) afin de maintenir la balance antioxydante. Ce processus se fait via la voie des pentoses phosphate, où la G6P déshydrogénase est l'enzyme limitante. Parmi les métabolites intermédiaires de cette voie, on retrouve le DHAP,

le G3P et le F6P, pouvant rejoindre la glycolyse ou alimenter la voie des pentoses phosphate. Le NADPH permet de tamponner des espèces réactives de l'oxygène (*reactive oxygen species*, ROS), et participe à la réduction de deux molécules de glutathion liées par un pont disulfure (GSSG) en glutathion (GSH), acteur majeur de la réponse antioxydante (*De Santis et al., 2018; Litwack, 2018a*).

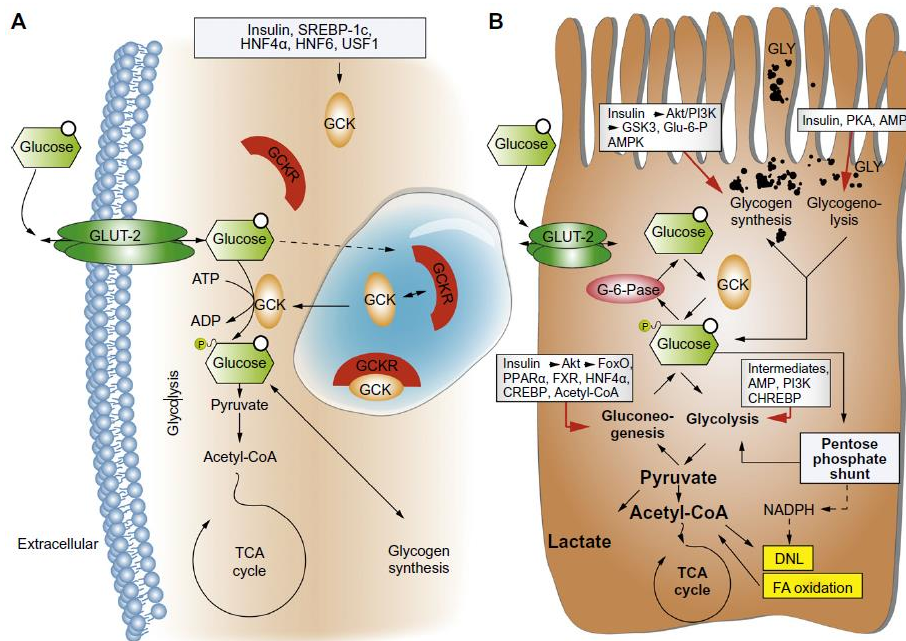


Figure 3. Régulation du métabolisme hépatique du glucose

(A) Le glucose est absorbé par l'hépatocyte via le récepteur GLUT2. La glucokinase GCK le phosphoryle en G6P, qui est dirigé vers la synthèse de glycogène ou la glycolyse, produisant le pyruvate qui alimente le cycle de Krebs. En condition de jeûne, lorsque les niveaux d'insuline sont bas, la GKR change de conformation et se lie à la GCK, ce qui la maintient inactive dans le noyau. (B) La dégradation du G6P au cours de la glycolyse fournit de l'énergie sous la forme de 2 ATP et de 2 NADH, H⁺ par molécule de glucose. Le pyruvate ainsi produit est décarboxylé en acétyl-CoA, qui rejoint le cycle de Krebs. Le G6P est également dégradé par la voie des pentoses phosphate, qui fournit du NADPH. La néoglucogénèse et la glycogénolyse fournissent du G6P comme substrat pour la synthèse du glucose à l'état de jeûne. La glycogénolyse est catalysée par la PYGL après son activation par l'AMP, et réprimée par l'insuline via la PKA. D'après *Bechmann et al., 2012*.

5. Glycogénolyse et néoglucogénèse

Dans des conditions à jeun, le foie produit de l'énergie en procédant à la glycogénolyse. La glycogène phosphorylase (PYGL) clive une molécule de glucose-1-phosphate (G1P) à partir du polymère de glycogène, qui sera convertie en G6P par une phosphoglucomutase. Le G6P rejoint alors la voie de la glycolyse. Il est intéressant de noter que la PYGL est activée par l'abondance d'AMP, et phosphorylée par la PKA lorsque l'insulinémie décroît (*Bechmann et al., 2012*).

Cependant, le glycogène s'épuise rapidement et le foie doit mettre en place d'autres mécanismes pour pallier ce défaut énergétique. En cas de jeûne prolongé, les hépatocytes vont initier le processus de néoglucogenèse, c'est-à-dire la synthèse de glucose à partir de substrats non-carbohydriques tels que le glycérol, le pyruvate, le lactate et certains acides aminés ([Holeček, 2023](#)).

a. À partir d'acides gras

La lipolyse du tissu adipeux libère des acides gras non-estérifiés (*non-esterified fatty acids*, NEFA) et du glycérol. Le glycérol va être phosphorylé en glycérol-3-phosphate par la glycérol kinase, puis va servir de donneur de protons pour générer du NADH, H⁺ dans le cytoplasme et du flavine adénine dinucléotide réduit (FADH₂) dans le complexe Q et le complexe III de la mitochondrie. Ces 2 réactions sont catalysées par la glycérol-3-phosphate déshydrogénase (GPD) pour produire du DHAP ([Bechmann et al., 2012](#); [Johanns et al., 2023](#)). Le DHAP rentre alors dans la voie de conversion pour produire du glucose.

Les NEFA alimentent la β -oxydation, générant ainsi de l'acétyl-CoA dans les mitochondries. L'acétyl-CoA va activer la pyruvate carboxylase, qui catalyse la conversion du pyruvate arrivant depuis le cytosol en oxaloacétate. L'oxaloacétate mitochondrial est converti en aspartate par l'aspartate aminotransférase (ASAT) pour pouvoir être exporté dans le cytosol par la navette malate/aspartate ([Bechmann et al., 2012](#); [Holeček, 2023](#)). Une fois dans le cytoplasme, l'aspartate est de nouveau converti en oxaloacétate par l'ASAT cytosolique puis en PEP par la phosphoénolpyruvate carboxykinase (PEPCK). Plusieurs réactions enzymatiques conduisent à la synthèse de G6P puis de glucose à partir du PEP, notamment par la glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) et la G6P phosphatase (G6Pase). Le glucose ainsi produit est libéré dans la circulation pour alimenter les autres organes via GLUT2 ([Johanns et al., 2023](#)).

b. À partir de lactate

Le lactate provenant des muscles est capté par les hépatocytes depuis la circulation via le transporteur *monocarboxylate transporter 1* (MCT1) et transformé en pyruvate par la lactate déshydrogénase (LDH). Cette enzyme est particulièrement sensible à l'équilibre d'oxydoréduction de la cellule ([Petersen et al., 2017](#)).

B) Métabolisme des acides gras

Les acides gras sont la deuxième source majeure d'énergie pour le foie. Il existe en permanence un flux d'acides gras dans l'organisme, qu'ils soient absorbés de l'alimentation et acheminés via les chylomicrons, sécrétés sous forme de *very low density lipoproteins* (VLDLs) ou sous forme de triacylglycérols (TAG) libérés depuis le tissu adipeux par le processus de lipolyse. En fonction de l'état énergétique de l'organisme, ils peuvent être absorbés, synthétisés à partir de glucose, ou bien stockés ([Bechmann et al., 2012](#); [Hodson and Gunn, 2019](#)). Une fois absorbés par l'hépatocyte, les acides gras peuvent être estérifiés afin de former des TAG ou des phospholipides, ou bien oxydés pour produire de l'énergie.

1. Structure des acides gras

Les acides gras sont tous constitués d'une fonction carboxyle et d'une chaîne hydrocarbonée plus ou moins longue. On distingue les acides gras à chaîne courte ($C < 8$), moyenne ($8 < C < 16$) et longue ($C > 16$). La chaîne carbonée peut présenter ou non une ou plusieurs doubles liaisons appelées insaturations. On parle alors d'acides gras saturés (*saturated fatty acids*, SFA) lorsque la chaîne ne présente pas de double liaison, et d'acides gras mono- ou poly-insaturés (*mono-/poly-unsaturated fatty acid*, MUFA/PUFA) ([Litwack, 2018b](#)). Les carbones présentant les doubles liaisons peuvent être positionnés en *cis*, c'est-à-dire du même côté de l'insaturation, ou alors en *trans*, c'est-à-dire de part et d'autre de l'insaturation. La conformation *cis* ou *trans* va avoir un impact sur la forme de la chaîne carbonée, qui pourra présenter une ou plusieurs courbures en fonction du nombre d'insaturations. Enfin, la nomenclature internationale désigne un acide gras par son nombre de carbones, suivi par le nombre d'insaturations. On peut également indiquer les positions des insaturations en considérant le carbone portant la fonction carboxyle comme étant C1. Il existe également une nomenclature utilisant l'alphabet grec, avec C1 désigné par α , C2 par β , etc., le dernier carbone étant toujours désigné par ω . Cette nomenclature sert le plus souvent à indiquer la position de la dernière insaturation par rapport au carbone ω . Ainsi, l'acide arachidonique, par exemple, sera désigné en tant que (20:4 Δ 5, 8, 9, 14) ou (20:4 ω 6) ([Blanco and Blanco, 2017a](#); [Litwack, 2018b](#)).

2. Transformation des acides gras

a. Acides gras provenant de la digestion

Pour pouvoir être absorbés au niveau intestinal, les lipides subissent une étape d'émulsification par les acides biliaires et d'hydrolyse par une lipase. Les entérocytes les internalisent et les conditionnent pour l'export dans des chylomicrons. Au cours de leur trajet dans le sang, les chylomicrons vont substituer les deux lipoprotéines apoA-I et apoA-IV par apoE et apoC-II, cette dernière étant essentielle pour l'activation de la lipoprotéine lipase (LPL) des adipocytes. Cette enzyme va digérer les TAG en acides gras libres pour pouvoir constituer les réserves du tissu adipeux. Les résidus de chylomicrons sont relargués dans la circulation et emportent avec eux une infime partie d'acides gras libres et du glycérol. Au niveau des hépatocytes, le récepteur *low density lipoprotein (LDL) receptor-related protein* (LRP) va reconnaître apoE et permettre l'endocytose des résidus de chylomicrons, qui seront hydrolysés par les lysosomes ([Bechmann et al., 2012](#); [Hodson and Gunn, 2019](#)).

b. Acides gras issus de la lipolyse du tissu adipeux

La lipolyse du tissu adipeux fournit des acides gras libres dans des conditions de jeûne. Les TAG subissent des hydrolyses successives par l'*adipose triglyceride lipase* (ATGL), l'*hormone-sensitive lipase* (HSL) puis la MAG lipase pour former respectivement du di-, monoacylglycérol (DAG, MAG) et un acide gras libre ([Zechner et al., 2012](#)). Du fait de leur nature hydrophobe, les acides gras libres doivent être couplés à l'albumine pour pouvoir circuler dans le sang. Au niveau des hépatocytes, ils sont captés à l'aide de plusieurs transporteurs membranaires : les *fatty acid transport proteins* (FATPs) et CD36 ([Grabner et al., 2021](#)). Les *fatty acid binding proteins* (FABPs) vont prendre en charge les acides gras dans le cytoplasme afin de les faire circuler entre les différentes organelles.

c. Lipogenèse de novo

L'hépatocyte a la capacité de synthétiser des acides gras à partir de l'acétyl-CoA issu de la glycolyse. L'acétyl-CoA peut également provenir de la conversion de citrate en acétyl-CoA par l'ATP-citrate lyase (ACLY) ([Alves-Bezerra and Cohen, 2017](#)).

L'acétyl-CoA est converti en malonyl-CoA par l'acétyl-CoA carboxylase (ACC). Cette enzyme existe sous 2 isoformes, ACC1 et ACC2, qui ont des fonctions distinctes. ACC1 produit le malonyl-CoA nécessaire à la lipogénèse dans le cytoplasme, tandis qu'ACC2 produit le malonyl-CoA permettant l'inhibition du transporteur mitochondrial carnitine/palmitoyl-transférase 1 (CPT1) régulant l'afflux d'acides gras à longue chaîne alimentant la β -oxydation. Ainsi, la lipogénèse et la β -oxydation ne peuvent pas avoir lieu simultanément (*Wakil and Abu-Elheiga, 2009*). Des études de simple ou double *knock-down* de ces deux protéines ont démontré le rôle distinct d'ACC1 et ACC2. Une délétion hépatospecifique d'ACC1 conduit à une diminution des taux cytoplasmiques de malonyl-CoA et de TAG, sans affecter le métabolisme des carbohydrates ni la β -oxydation (*Mao et al., 2006*). La délétion d'ACC2, quant à elle, active la β -oxydation de façon constitutive et réduit la capacité des hépatocytes à stocker des TAG (*Abu-Elheiga et al., 2003, 2001*). La double délétion d'ACC1 et ACC2 améliore l'insulinorésistance hépatique dans un modèle de stéatose induite par un régime chez le rat (*Kreuz et al., 2009; Savage, 2006*). L'état d'activation d'ACC est dépendant de l'insuline. En effet, ACC est phosphorylée par l'AMPK à l'état à jeun, ce qui inhibe ses fonctions. En présence d'insuline, ACC est déphosphorylée par la protéine phosphatase 2 (*Litwack, 2018b*).

La deuxième étape de la lipogénèse est la conversion du malonyl-CoA en palmitate (C16:0) par des condensations successives de malonyl-CoA sur une molécule d'acétyl-CoA par la *fatty acid synthase* (FAS) (*Wallace and Metallo, 2020*). A partir du palmitate, il est possible d'allonger et de désaturer la chaîne carbonée. Ces réactions ont lieu dans le réticulum endoplasmique (RE) sous le contrôle des protéines *elongation of very long chain fatty acids* (ELOVLs) et stéaroyl-CoA décarboxylase (SCD1) respectivement. Chez les mammifères, il existe 7 isoformes d'ELOVLs qui ont des affinités différentes de substrats. ELOVL5 et 6 ont été particulièrement étudiées dans le foie. ELOVL5 contribue à la synthèse des PUFA, et sa délétion dans un modèle murin entraîne une diminution de la quantité de ses produits associée à une activation de la lipogénèse dans le foie conduisant à une accumulation de TAG (*Moon et al., 2009*). ELOVL6 est la seule élongase permettant la synthèse du stéarate (C18:0) et de l'oléate (C18:1 ω 9), les souris *ELOVL6^{-/-}* présentant une accumulation de palmitate, le précurseur de ces deux acides gras (*Moon et al., 2014*). SCD1 permet la synthèse d'acide palmitoléique (C16:1) et d'oléate à partir de palmitate et de stéarate. En plus de ses propriétés enzymatiques, SCD1 est aussi un régulateur de la lipogénèse. Sa délétion hépatospecifique provoque une inhibition de la lipogénèse, tandis qu'un KO total induit une

diminution du tissu adipeux et une meilleure sensibilité à l'insuline (*ALJohani et al., 2017*). Il est important de noter que la lipogenèse *de novo* permet de synthétiser uniquement des acides gras $\omega 9$, les mammifères ne possédant pas les désaturases nécessaires pour synthétiser des $\omega 3$ et $\omega 6$. Ceux-ci sont donc dits essentiels et doivent être supplémentés par l'alimentation (*Blanco and Blanco, 2017b*).

3. Synthèse des TAG et sécrétion des VLDL

Les acides gras libres, qu'ils soient néosynthétisés ou absorbés, sont générateurs de ROS, ils ne restent donc pas très longtemps sous cette forme dans l'hépatocyte. Ils vont être convertis en TAG et stockés transitoirement dans l'hépatocyte sous forme de gouttelettes lipidiques, ou exportés dans la circulation vers les muscles et le tissu adipeux sous forme de VLDLs.

Pour être métabolisés, les acides gras libres sont couplés à une molécule de coenzyme A (CoA) par une *long chain acyl-CoA synthetase* (ACSL) pour former un *fatty acyl-CoA*. Celui-ci est estérifié à une molécule de G3P par la G3P acyl-transférase mitochondriale (mGPAT) pour former l'acide lysophosphatidique. Ce dernier est ensuite acylé par l'acylglycérol-3-phosphate acyltransférase (AGPAT) dans le RE pour former de l'acide phosphatidique, puis la phosphatidate phosphohydrolase le convertit en DAG. La DAG acyltransférase (DGAT) estérifie le dernier acide gras pour former le TAG (*Alves-Bezerra and Cohen, 2017*).

Dans le RE, la *microsomal triglyceride transfer protein* (MTTP) stabilise la lipoprotéine ApoB100 qui est traduite localement et y incorpore les TAG. Au cours de la transition d'ApoB100 vers l'appareil de Golgi grâce à la *VLDL transfer vesicle* (VTV), d'autres TAG et du cholestérol s'ajoutent à la particule de VLDL naissante qui sera alors sécrétée dans la circulation sanguine (*Alves-Bezerra and Cohen, 2017*).

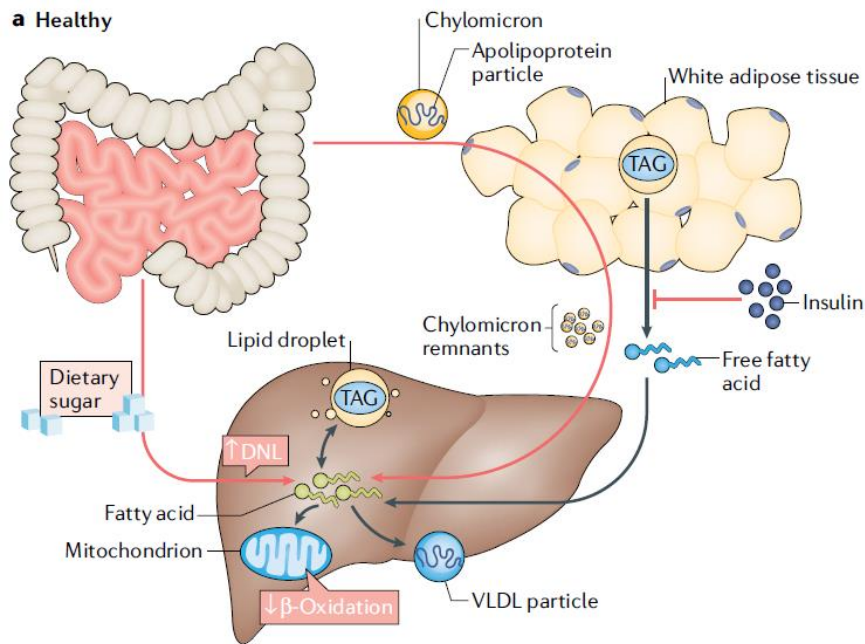


Figure 5. Flux d'acides gras vers et depuis le foie

Lorsque le taux d'insuline est faible (flèches noires), l'hydrolyse des TAG du tissu adipeux libère des acides gras non-estérifiés qui rejoignent le foie via l'artère hépatique. Ils peuvent alors servir à synthétiser des TAG, qui sont incorporés dans des VLDL pour l'export vers les tissus périphériques ou stockés dans des gouttelettes lipidiques. Les acides gras peuvent également être oxydés, via la β -oxydation pour produire de l'énergie. Après un repas (flèches rouges), les lipides alimentaires sont incorporés dans les chylomicrons sous forme de TAG avant d'entrer dans la circulation. Au niveau du tissu adipeux, la lipoprotéine lipase libère les acides gras, et les résidus de chylomicrons sont absorbés par le foie. Le glucose absorbé peut être utilisé pour former des acides gras par lipogenèse de novo. L'augmentation postprandiale des niveaux d'insuline supprime l'hydrolyse des TAG dans le tissu adipeux, induit la voie de la lipogenèse et inhibe des voies d'oxydation des acides gras. D'après [Hodson and Gunn, 2019](#).

4. Acides gras comme source d'énergie

Les acides gras de toutes origines peuvent être oxydés. La voie classique est la β -oxydation dans la mitochondrie, où sont destinés tous les acides gras à chaîne courte, moyenne et longue ($C < 20$). Les acides gras à très longue chaîne, ou à chaîne branchée sont quant à eux oxydés dans les peroxysomes. Il existe également les α - et ω -oxydations qui peuvent avoir lieu dans le RE et sont sous la dépendance de protéines de la famille des cytochromes P450 4A ([Alves-Bezerra and Cohen, 2017](#)).

a. β -oxydation

Tout comme pour la synthèse des TAG, les acides gras destinés à la β -oxydation ont besoin d'être activés en étant acylés par ACSL. CPT1 convertit les *fatty acyl-coA* en *fatty acyl-carnitine* et les fait entrer dans l'espace intermembranaire de la mitochondrie où la carnitine-acyl-carnitine transférase (CACT) les fait traverser la membrane interne. Dans le

cytoplasme mitochondrial, CPT2 reconvertit l'acyl-carnitine en acyl-CoA (*M. Wang et al., 2021*). Durant chaque cycle de β -oxydation (ou hélice de Lynen), 4 réactions successives permettent de générer une molécule d'acétyl-CoA, une molécule de FADH_2 et une molécule de NADH , H^+ , avec des variations en fonction du nombre pair ou impair de carbones de l'acide gras, et de la présence d'une ou plusieurs insaturations. Les électrons ainsi transférés rejoignent la chaîne respiratoire et contribuent à la synthèse d'ATP (*Blanco and Blanco, 2017b*). L'acétyl-CoA quant à lui peut intégrer le cycle de Krebs ou être converti en corps cétoniques via la cétogenèse. Cependant, tous les acides gras ne peuvent pas être oxydés dans la mitochondrie. Par exemple, les acides gras à très longue chaîne ou à chaîne branchée subissent un certain nombre de cycles d'oxydation dans les péroxysomes, avant d'être transférés vers les mitochondries. Les enzymes procédant à l'oxydation dans les peroxysomes sont différentes de celles localisées dans la mitochondrie, et les protons générés sont directement transformés en H_2O_2 puis en $\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$ par la catalase peroxysomale (*Blanco and Blanco, 2017b*).

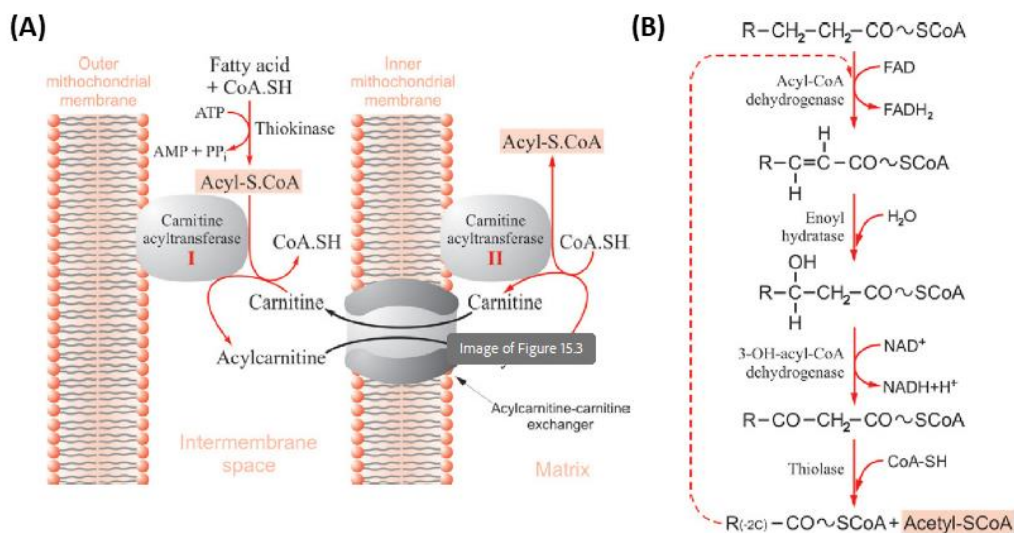


Figure 6. Production d'énergie par l'oxydation des acides gras

(A) La carnitine/palmitoyl-transférase 1 (CPT1) transfère une molécule de fatty acyl-CoA dans l'espace intermembranaire mitochondrial en le convertissant en fatty acyl-carnitine. CPT2 l'importe dans la mitochondrie en le convertissant à nouveau en fatty acyl-CoA. (B) Chaque boucle de β -oxydation permet de produire 1 FADH_2 et 1 NADH , H^+ . Adapté de *Blanco and Blanco, 2017b*.

b. Cétogenèse

En conditions de jeûne prolongé, l'acétyl-CoA issu de la β -oxydation emprunte la voie de la cétogenèse. Deux molécules d'acétyl-CoA sont fusionnées par la thiolase acétyl-CoA

acétyltransférase (ACAT) pour former de l'acétoacétyl-CoA. Celui-ci est converti en 3-hydroxy-3-méthylglutaryl (HMG)-CoA par l'HMG-CoA synthase (HMGCS), puis l'HMG-CoA lyase (HMGCL) le transforme en acétoacétate. Ce dernier peut être utilisé comme tel, déshydrogéné en β -hydroxybutyrate par la beta-hydroxybutyrate déshydrogénase (BHBDH) ou se décarboxyler de manière non-enzymatique pour donner de l'acétone (*Blanco and Blanco, 2017b*). Ces corps cétoniques hydrosolubles sont relargués dans la circulation pour alimenter les autres organes. Les muscles et le cœur par exemple les utilisent immédiatement, cependant le cerveau les métabolise seulement en dernier recours après une longue période de jeûne (*Blanco and Blanco, 2017b*). De manière intéressante, le foie lui-même n'utilise pas les corps cétoniques pour produire son énergie, puisqu'il ne possède pas les enzymes nécessaires à leur dégradation.

Le devenir de l'acétyl-CoA issu de la β -oxydation est conditionné par la concentration en oxaloacétate. En effet, en conditions de déficit énergétique, l'oxaloacétate est préférentiellement utilisé pour la néoglucogénèse. Il n'est donc plus disponible pour le cycle de Krebs, ce qui dirige l'acétyl-CoA vers la cétogénèse (*Kolb et al., 2021*).

c. Cycle de Krebs

Le cycle de l'acide tricarboxylique ou cycle de Krebs est au centre du fonctionnement mitochondrial. L'acétyl-CoA provenant de la glycolyse et de la β -oxydation est condensé avec l'oxaloacétate pour produire du citrate. Plusieurs réactions permettent de générer à nouveau de l'oxaloacétate pour démarrer un nouveau cycle. A chaque boucle, une molécule de GTP (pouvant être convertie en ATP), deux NADH, H^+ et un $FADH_2$ sont générés. Les électrons ainsi donnés rejoignent la chaîne de transport des électrons et alimentent l'ATP synthase pour générer de l'ATP (*Martínez-Reyes and Chandel, 2020*).

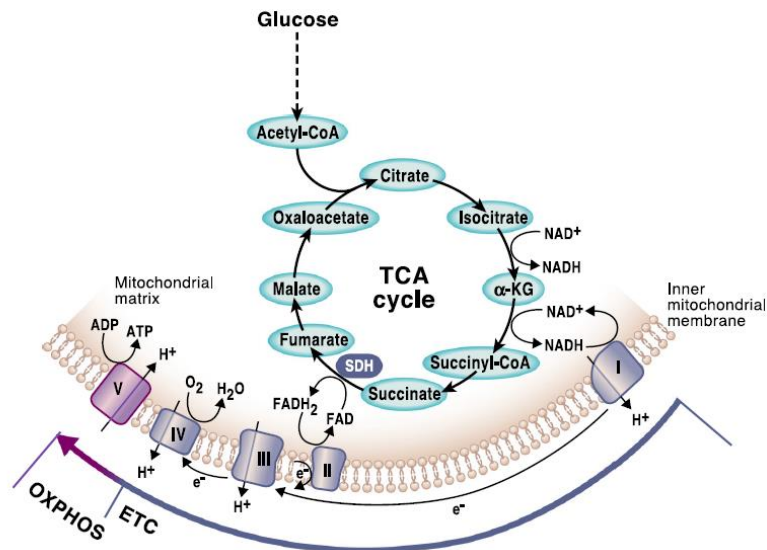


Figure 7. Synthèse d'ATP grâce au cycle de Krebs

L'acétyl-CoA de différentes origines est pris en charge par le cycle de Krebs afin de générer des protons qui, grâce aux complexes mitochondriaux, alimentent l'ATP synthase. D'après [Martínez-Reyes and Chandel, 2020](#).

C) Métabolisme du cholestérol

Le cholestérol est un composé essentiel des membranes cellulaires. On le retrouve dans les radeaux lipidiques de la membrane plasmique, mais également dans les membranes de l'appareil de Golgi, des mitochondries ou du RE, dans des proportions différentes ([Ouweneel et al., 2020](#)). Il contribue à la fluidité des membranes, à la transduction de signaux et au trafic intra-cellulaire. C'est également le précurseur des hormones stéroïdiennes, des acides biliaires et de la vitamine D ([Zhou and Sun, 2021](#)). Le cholestérol libre présent dans les hépatocytes provient de l'alimentation à hauteur de 30%, les 70% restants correspondant au cholestérol synthétisé *de novo* ([Zhou and Sun, 2021](#)). Malgré la capacité de toutes les cellules à synthétiser du cholestérol, le foie est le producteur majoritaire ([Luo et al., 2020](#)).

1. Absorption du cholestérol

Tout comme les acides gras, le cholestérol est absorbé au niveau des entérocytes au moment de la digestion. Le récepteur *Niemann–Pick type C1-like 1* (NPC1L1) capte le cholestérol et est internalisé dans une vésicule d'endocytose. Le cholestérol est ensuite conditionné dans les chylomicrons avec les acides gras. Après relargage de ces derniers dans le tissu adipeux, les résidus de chylomicrons enrichis en cholestérol sont captés via le LRP au niveau du foie ([Luo et al., 2020](#)). NPC1L1 est stocké dans les *endocytic recycling compartments* (ERC) du système d'endocytose des entérocytes lorsque les niveaux de cholestérol sont faibles, et est

transloqué à la membrane plasmique lorsque le cholestérol devient abondant (*Yu et al., 2006*). L'expression de NPC1L1 est sous le contrôle de SREBP2 (décrit ci-après), son expression est donc également dépendante des taux de cholestérol intracellulaire. Il a également été montré que l'expression de NPC1L1 pourrait être dépendante du récepteur nucléaire *liver X receptor* (LXR, dont le fonctionnement sera développé au paragraphe **III, D**), cependant les mécanismes directs ou indirects de cette interaction restent encore inconnus (*Duval et al., 2006*).

2. Synthèse du cholestérol

La biosynthèse du cholestérol se fait dans le RE à partir d'acétyl-CoA et nécessite une vingtaine de réactions. Le cholestérol ainsi produit est métabolisé pour produire des oxystérols, exporté vers d'autres organes via les VLDL, ou excrété sous forme d'acides biliaires. Le processus de biosynthèse est régulé par le facteur de transcription *sterol regulatory element-binding protein isoform 2* (SREBP2), dont le fonctionnement sera détaillé au paragraphe **III, B**. Au niveau protéique cependant, les enzymes limitantes sont l'HMG CoA réductase (HMGCR) et la squalène époxydase (SQLE). HMGCR initie la synthèse du cholestérol en produisant du mévalonate à partir d'HMG-CoA, et SQLE convertit le squalène pour former du lanostérol puis du cholestérol (*Goldstein et al., 2006; Luo et al., 2020*).

L'activité de l'HMGCR est régulée de plusieurs manières. Premièrement, elle-même est une cible de SREBP2, donc son gène ne sera pas transcrit en abondance de cholestérol (*Goldstein et al., 2006*). Ensuite, au niveau protéique, elle peut être phosphorylée par l'AMPK afin d'inhiber la synthèse de cholestérol lorsque les niveaux d'ATP sont bas (*Sato et al., 1993*). Enfin, elle est dégradée via un complexe d'ubiquitylation lié à une fraction des *insulin-induced genes* (INSIGs), protéines de rétention présentes dans la membrane du RE. Ce complexe est constitué des ubiquitine-ligases *RING finger protein 45* (RNF45), RNF139 et RNF145, d'un donneur d'ubiquitine, l'*ubiquitin-conjugating protein 7* (UBC7P) et de l'ATPase *valosin-containing protein* (VCP) (*Luo et al., 2020*). En présence de lanostérol, 25- ou 27-OHC, qui ont été démontrés comme de meilleurs régulateurs de la dégradation que le cholestérol (*Chen et al., 2019; Song et al., 2005*), HMGCR se lie à INSIG et est ubiquitylée puis dégradée via la voie de l'*ER-associated degradation* (ERAD). Sa phosphorylation inhibitrice n'empêche pas sa dégradation.

SQLE est également une protéine transmembranaire du RE, et son activité est aussi régie par des régulations transcriptionnelles et post-traductionnelles. C'est aussi une cible directe de SREBP2, cependant sa dégradation ne dépend pas d'INSIG, mais est sous le contrôle des ubiquitine ligases *ubiquitin-conjugating enzyme 2 J2* (UBE2J2) et *membrane-associated ring-CH-type finger 6* (MARCH6) (Luo et al., 2020).

3. Oxystérols

Les oxystérols sont des dérivés mono-oxygénés du cholestérol, répartis en deux classes selon la nature de l'oxydation. L'oxydation de la chaîne latérale produit entre autres du 24-, 25- ou 27-hydroxycholestérol (OHC), et l'oxydation du noyau, notamment sur le carbone 7, produit du 7 α /7 β -OHC ou du 7-kéto-OHC. À l'état physiologique, ils sont présents en faibles quantités et participent à de nombreuses fonctions cellulaires, telles que la régulation du métabolisme du cholestérol (liaison avec INSIG), la signalisation cellulaire, la fluidité membranaire, et surtout l'activation de LXR (Bielska et al., 2012; Kloudova et al., 2017).

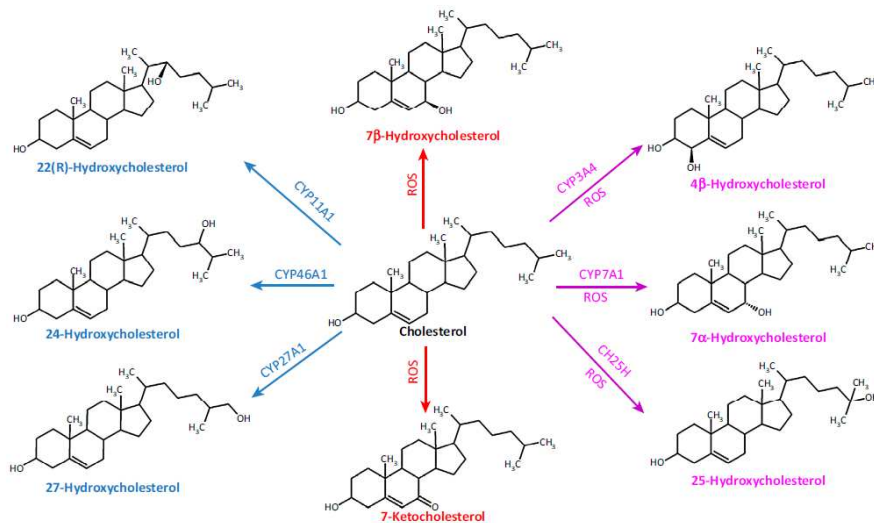


Figure 8. Les différents oxystérols synthétisés par le foie

Les oxystérols peuvent être formés par des réactions enzymatiques et non enzymatiques. L'oxydation enzymatique du cholestérol, médiée par des enzymes de la famille du cytochrome P450 (CYP) et la cholestérol-25-hydroxylase (CH25H), produit des oxystérols à chaîne latérale (bleu). Les oxystérols cycliques sont générés par une oxydation non-enzymatique médiée par des espèces réactives de l'oxygène (ROS) (rouge). Certains oxystérols sont générés à la fois par des réactions enzymatiques et non enzymatiques (violet). D'après Kloudova et al., 2017.

4. Export et recyclage du cholestérol

Le cholestérol en excès peut être estérifié (CE) sous la dépendance de l'acyl-CoA cholestérol acyltransférase (ACAT) et stocké dans des gouttelettes cytoplasmiques, ou alors exporté vers la circulation. Il existe 2 isoformes d'ACAT : ACAT1 est exprimée de manière ubiquitaire mais surtout dans les macrophages, les cellules épithéliales et les organes stéroïdogènes, tandis qu'ACAT2 est majoritairement exprimée par les entérocytes et les hépatocytes (Luo et al., 2020). Pour alimenter l'organisme en cholestérol, le foie l'exporte sous forme de CE avec les TAG dans les VLDL. Au fur et à mesure, les TAG vont être métabolisés, ce qui va induire la diminution de la densité des VLDL, donnant ainsi des *low density lipoproteins* (LDL) riches en cholestérol. Les LDL sont endocytées grâce au LDLR et leur contenu est pris en charge par le système de dégradation endosomal de la cellule. De manière intéressante, les deux protéines régulant l'envoi à la dégradation du LDLR, à savoir *inducible degrader of the LDL receptor* (IDOL) et *proprotein convertase subtilisin-kexin type 9* (PCSK9), sont respectivement des cibles de LXR et SREBP2 (Luo et al., 2020)

Hormis les hépatocytes et les cellules des organes stéroïdogènes, tous les autres types cellulaires exportent le cholestérol, n'ayant pas le nécessaire enzymatique pour son catabolisme. Certains transporteurs de la superfamille des *ATP binding cassette* (ABC) régulent l'efflux de cholestérol vers la circulation. Ils sont exprimés de manière hétérogène dans les différents tissus, avec notamment ABCA1 et ABCG1 exprimés par les macrophages, et ABCG5 et ABCG8 exprimés par les hépatocytes. Pour réguler les taux de cholestérol de l'organisme, le foie sécrète la lipoprotéine ApoA1 dans la circulation. Celle-ci va interagir avec le transporteur ABCA1 de différents types cellulaires afin de capter du CE et des phospholipides pour ainsi former des *pre-high density lipoproteins* (pHDL). Au cours de leur parcours, les pHDL vont maturer en HDL et pouvoir interagir avec ABCG1 et récupérer davantage de CE. Enfin, les HDL sont endocytées par le foie via le *scavenger receptor B1* (SR-B1) ou le LDLR et le cholestérol ainsi récupéré peut être recyclé (Ben-Aicha et al., 2020).

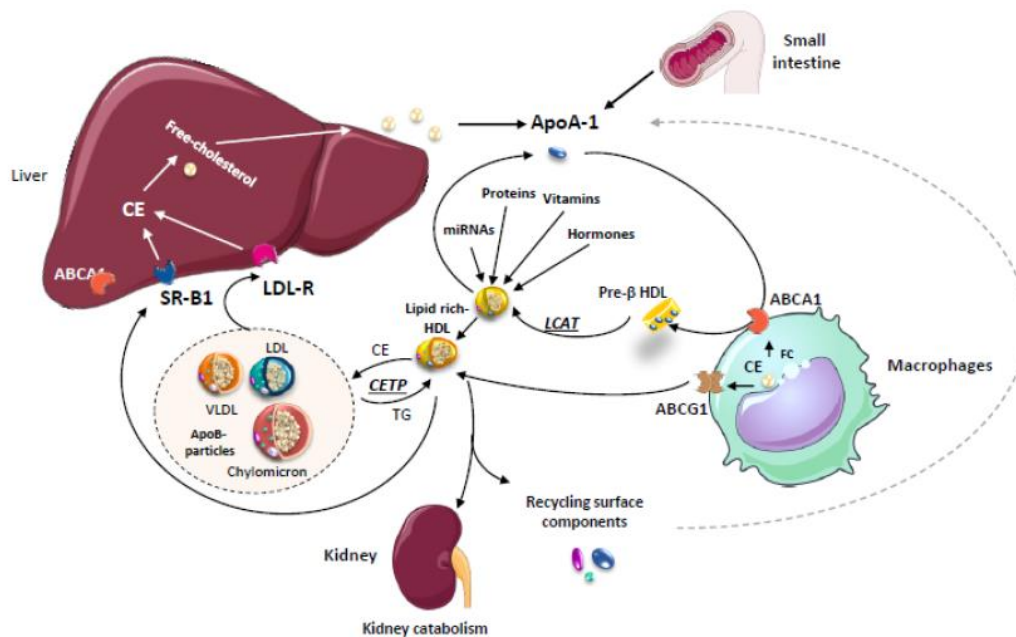


Figure 9. Recyclage du cholestérol depuis les organes vers le foie via les HDL

L'Apo-I sécrétée par le foie ou l'intestin grêle forme les pré-HDL. Elles absorbent le cholestérol depuis différents types de cellules, y compris les macrophages, via le transporteur ABCA1. Parallèlement, d'autres constituants moléculaires, notamment des miARN, des protéines, des hormones et des vitamines, sont incorporés dans les HDL. Le cholestérol libre dans les HDL est ensuite estérifié (CE) par la lécithine/cholestérol acyltransférase (LCAT). Les HDL matures riches en lipides échangent des lipides avec des particules contenant de l'ApoB (chylomicrons, VLDL, LDL) par l'intermédiaire de la cholesteryl ester transfer protein (CETP), et avec les macrophages par l'intermédiaire d'ABCG1. Enfin, les récepteurs hépatiques scavenger (SR)-B1 et LDLR internalisent les HDL dans les hépatocytes. D'après [Ben-Aicha et al., 2020](#).

5. Synthèse et excrétion des acides biliaires

Les acides biliaires sont des molécules complexes dont la synthèse peut se faire selon une voie classique et une voie alternative. La voie classique est initiée par l'enzyme limitante cytochrome P450 7 α -hydroxylase (CYP7A1) et comporte environ 15 réactions. Elle permet de synthétiser des acides biliaires tels que l'acide cholique, l'acide chénodésoxycholique chez l'homme, et les acides α - ou β -muricholiques chez la souris ([Chávez-Talavera et al., 2017](#)). La voie alternative est initiée par CYP24A1 et représente entre 3 et 18% de la production totale d'acides biliaires chez l'homme ([Chávez-Talavera et al., 2017](#)). De manière intéressante, cette synthèse se fait dans les hépatocytes périveineux, les acides biliaires sont relargués dans les canalicules biliaires via ABCB11. La circulation des acides biliaires est inverse à celle du sang. Ainsi, les canalicules biliaires rejoignent les canaux biliaires des espaces porte, puis sont déversés dans la vésicule biliaire ([Lefebvre et al., 2009](#)). En plus des acides biliaires, les hépatocytes excrètent également du cholestérol libre et d'autres stérols via les transporteurs ABCG5 et ABCG8 ([Luo et al., 2020](#)). Afin de diminuer la toxicité des acides biliaires et de favoriser la formation de micelles, d'autres lipides sont déversés dans la

bile, notamment des phospholipides, dont l'excrétion se fait via le transporteur ABCB4 (*Stättermayer et al., 2020*).

La régulation de la synthèse des acides biliaires et de l'excrétion du cholestérol dans la bile est dépendante de LXR et de *farnesoid X receptor* (FXR). En effet, les enzymes de la synthèse des acides biliaires sont sous la régulation transcriptionnelle de LXR, et l'inhibition de la voie est régulée par FXR (*Chiang and Ferrell, 2022*).

6. Autres voies de régulation de l'homéostasie du cholestérol

Deux études récentes ont mis en évidence un autre système de régulation de l'homéostasie du cholestérol via les facteurs de transcription *nuclear factor erythroid 2 related factor-1* (NFE2L1) et -2 (NFE2L2) (*Akl et al., 2023; Widenmaier et al., 2017*). Ces deux protéines sont surtout connues pour réguler l'expression des gènes impliqués dans les réponses au stress, notamment le stress oxydant (*Northrop et al., 2020; Yamamoto et al., 2018*). NFE2L1 est une protéine membranaire du RE, tandis que NFE2L2 est séquestrée dans le cytoplasme par *Kelch-like ECH-associated protein 1* (KEAP1). Une fois dans le noyau, elles induisent la transcription de gènes comportant des *antioxydant response elements* (ARE).

Widenmaier *et al.* démontrent que NFE2L1 est sensible aux niveaux de cholestérol, et que celui-ci induit son maintien dans le RE, empêchant ses fonctions de facteur de transcription. Les souris *Nfe2l1*^{-/-} hépatospécifique présentent une accumulation sévère de lipides dans le foie associée à des dommages du parenchyme hépatique lorsqu'elles sont nourries avec un régime riche en cholestérol. De plus, les foies *Nfe2l1*^{-/-} présentent une signature transcriptionnelle inflammatoire élevée et une signature de synthèse d'acides biliaires diminuée. CD36, qui est connu pour participer à l'inflammation lorsque le métabolisme des lipides est perturbé, est une cible directe de NFE2L1, et son blocage restaure un phénotype normal dans des hépatocytes primaires *Nfe2l1*^{-/-} stimulées au cholestérol. Enfin, il semblerait que NFE2L1 régule l'activité de LXR, puisqu'en condition d'excès de cholestérol, une forme tronquée de NFE2L1 insensible au cholestérol provoque une diminution de l'expression de cibles connues de LXR.

NFE2L1 et NFE2L2 semblent cibler des gènes intervenant dans l'export du cholestérol via les acides biliaires. En effet, Akl *et al.* démontrent qu'une double délétion provoque une accumulation hépatique de cholestérol et de cristaux de cholestérol, ainsi qu'une stéatose

associée à de l'inflammation. Des analyses de *RNA sequencing* (RNAseq) révèlent une diminution de l'expression de gènes impliqués dans les voies d'élimination du cholestérol par les acides biliaires et une augmentation de l'expression de gènes liés à l'inflammation dans les foies de souris doublement déficientes. Des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine ont montré que les deux facteurs de transcription interagissent avec les promoteurs de gènes intervenant dans le métabolisme des acides biliaires, la détoxification, et la régulation du stress oxydant. L'analyse des acides biliaires a révélé augmentation de leur quantité, mais une diminution considérable du cholestérol dans les acides biliaires dans ces souris. Enfin, NFE2L1 et NFE2L2 semblent être requis tous les deux pour médier les effets anti-stéatosiques et anti-inflammatoires de l'activateur synthétique de NFE2L2, la bardoxolone, puisque les souris *Nfe2l1*^{-/-} hépatospécifique ne présentent aucune diminution de la stéatose.

III. Interconnexion des voies de régulation

Étant donné l'interconnexion des métabolismes du glucose, des acides gras et du cholestérol, les voies de régulation qui les régissent sont particulièrement complexes. Le premier niveau de régulation est l'état énergétique de l'organisme, traduit par l'abondance d'insuline ou de glucagon. En conditions post-prandiales, l'abondance d'insuline favorise le stockage du glucose et des acides gras. Au contraire, l'abondance de glucagon, dans des conditions de besoin énergétique, inhibe les voies de stockage et favorise la néoglucogenèse, la lipogenèse et la β -oxydation. Le deuxième niveau de régulation se fait au niveau protéique, avec l'activation ou l'inhibition des différentes enzymes par des phosphorylations ou déphosphorylations. Enfin, le dernier niveau de régulation dépend de l'induction ou la répression de la transcription des gènes intervenant dans les différentes voies. Ainsi, plusieurs facteurs de transcriptions régissent les voies métaboliques, et leur activité est également contrôlée. Dans cette partie sera détaillée uniquement la régulation de la lipogenèse hépatique et de la synthèse du cholestérol, puisque le métabolisme du glucose, malgré son importance au niveau de l'organisme, est au-delà de la portée des travaux présentés dans cette thèse.

A) Signalisation insulino-dépendante

L'insuline est produite et sécrétée au niveau du pancréas par les cellules β en réponse à un taux sanguin de glucose élevé (Meier, 2016). Son rôle dans le contrôle de la lipogenèse hépatique a été mis en évidence grâce à un modèle murin déficient en récepteur à l'insuline spécifiquement dans le foie (*liver insulin receptor knock-out*, LIRKO) (Michael et al., 2000). Lorsque l'insuline se lie à son récepteur, celui-ci s'autophosphoryle, facilitant le recrutement de plusieurs protéines adaptatrices qui seront à leur tour phosphorylées par l'IR. L'*insulin receptor substrate* (IRS) phosphorylé permet de recruter la phosphatidylinositol 3 kinase (PI3K). Celle-ci phosphoryle le phosphatidylinositol 4,5-biphosphate (PIP2) présent dans la membrane plasmique en phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate (PIP3). Le PIP3 permet de recruter à la membrane et d'activer la pyruvate déshydrogénase kinase 1 (PDK1), qui va phosphoryler Akt. Cette dernière va activer le complexe *mammalian target of rapamycin complex 1* (mTORC1), qui participe à la régulation du facteur de transcription régulant la lipogenèse, SREBP1c. (Titchenell et al., 2017).

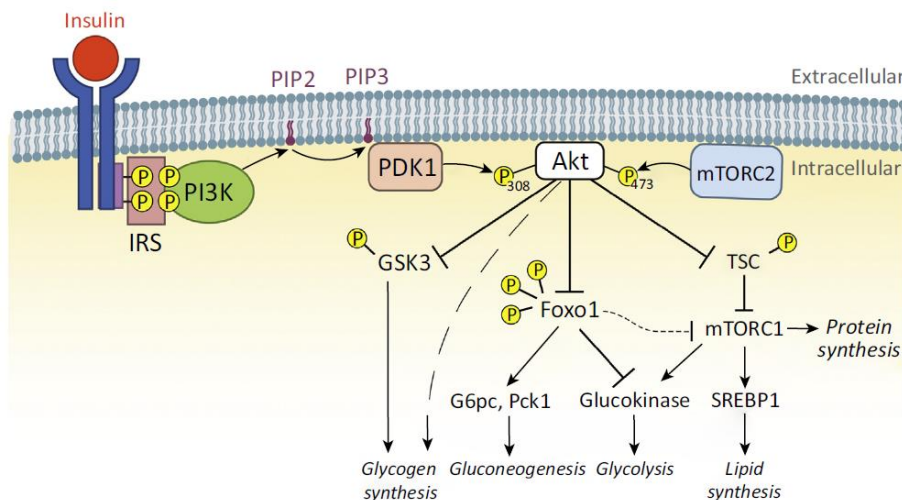


Figure 10. Voie PI3K induite par l'insuline

L'autophosphorylation de l'IR recrute IRS puis la PI3K, qui va convertir le PIP2 en PIP3. Ce dernier active PDK1, qui phosphoryle Akt sur sa Thr308. AKT inhibe le répresseur de mTORC1 (*tuberous sclerosis complex*, TSC), complexe qui agit positivement sur la régulation de SREBP1c. D'après Titchenell et al., 2017.

B) Facteurs de transcription SREBP

Les facteurs de transcription *sterol regulatory element-binding protein* (SREBP) comportent 3 membres codés par 2 gènes distincts. Le premier gène code les protéines SREBP1a et

SREBP1c, qui diffèrent uniquement par leur premier exon, et le deuxième gène code SREBP2 (Ferré et al., 2021). Ils ont une structure similaire divisée en trois segments : un domaine N-terminal de type *basic-helix-loop-helix-leucine zipper* (bHLHLZ) qui possède l'activité transcriptionnelle, un domaine comportant deux segments transmembranaires séparés par une boucle, et un domaine C-terminal permettant l'interaction avec SCAP. Ils sont ancrés dans la membrane du RE, les domaines N- et C-terminaux orientés vers le cytoplasme (Hua et al., 1995). SREBP1a est surtout exprimé par les cellules proliférantes, tandis que SREBP1c est exprimé par tous les types cellulaires, mais son expression est particulièrement accentuée dans le foie, le tissu adipeux, les glandes surrénales et le cerveau (Shimomura et al., 1997). Ils ciblent des gènes comportant un *sterol response element* (SRE) dans leur promoteur et induisent la transcription de nombreux gènes impliqués dans l'homéostasie des lipides pour SREBP1c, celle du cholestérol pour SREBP2, et les deux pour SREBP1a.

1. Clivage protéolytique

Les SREBP sont systématiquement couplés à *SREBP cleavage-activating protein* (SCAP), une autre protéine transmembranaire possédant un *sterol sensing domain* (SSD) dans sa région transmembranaire (Ferré et al., 2021; Goldstein et al., 2006).

Pour pouvoir être activés, les SREBP doivent être transloqués du RE vers l'appareil de Golgi. Le domaine transmembranaire de SCAP contient un peptide signal MELADL permettant le recrutement de la GTPase *secretion-associated RAS superfamily 1* (SAR1). Cette dernière, après acquisition d'un GTP via SEC12, va s'ancrer dans la membrane du RE et recruter séquentiellement l'hétérodimère SEC23/24 et le complexe SEC13 pour former la vésicule de transport permettant l'acheminement de SCAP-SREBP vers l'appareil de Golgi (Barlowe et al., 1994). Après avoir intégré la membrane du Golgi, le SREBP va subir un premier clivage dans son domaine transmembranaire par la *site-1 protease* (S1P), puis un second au niveau de son domaine bHLHLZ par *site-2 protease* (S2P) (Ferré et al., 2021; Goldstein et al., 2006).

La rétention des SREBP dans le RE dépend des protéines *insulin-induced gene* (INSIG), de l'insuline et des niveaux intramembranaires de cholestérol et d'oxystérols. INSIG1 et INSIG2 sont deux isoformes dont l'expression dépend de l'insuline. En effet, INSIG1 est induite par celle-ci, tandis qu'INSIG2 est réprimée (Hegarty et al., 2005; Yabe et al., 2002). Il est intéressant de noter que l'expression d'INSIG1 est régulée par SREBP1c mais pas INSIG2 (Yabe et al., 2002).

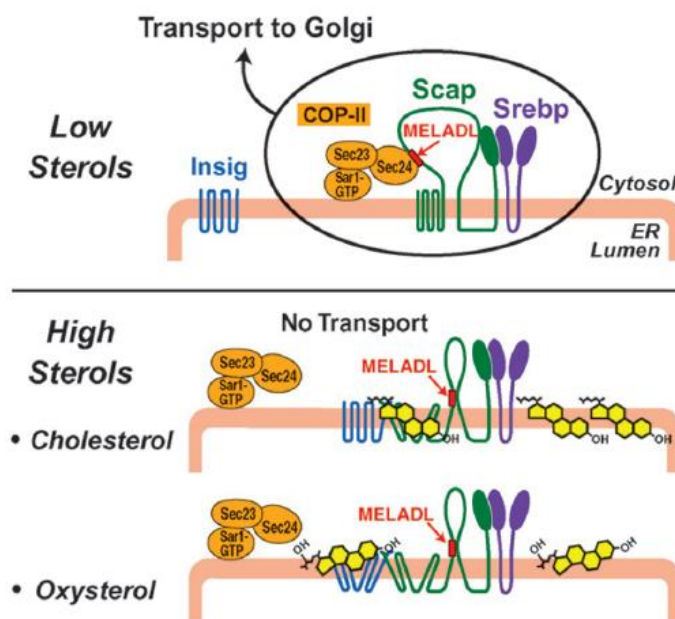


Figure 11. Complexe de régulation des SREBP dans la membrane du RE

Lorsque la quantité de cholestérol dans la membrane du RE est faible, le peptide MELADL de SCAP se lie à Sec24, un composant du complexe Sar1/Sec23/Sec24 des protéines d'enveloppe des vésicules de transport (complexe COP-II). Cette liaison permet le chargement des complexes SCAP/SREBP dans ces vésicules qui quittent le RE vers l'appareil de Golgi. Le cholestérol et les oxystérois favorisent la liaison de SCAP aux INSIGs. Le cholestérol se lie directement à SCAP, qui change de conformation et se lie à INSIG. Les oxystérois se lient directement à INSIG, qui n'est plus dégradé et peut se lier à SCAP. Dans les deux cas, le résultat final est un changement de conformation de SCAP qui empêche les protéines d'export d'accéder à la séquence MELADL. D'après [Brown and Goldstein, 2009](#).

2. Régulation de l'activité de SREBP1c par l'insuline

Contrairement à SREBP2, l'activation de SREBP1c est indépendante des niveaux cellulaires de stérois mais régulée par l'insuline. En effet, l'ARN de SREBP1c est induit dans l'hépatocyte lorsque les niveaux d'insuline augmentent, et son expression diminue en présence de glucagon ([Foretz et al., 1999](#)). De plus, l'inhibition de la sécrétion d'insuline par la streptozotocine (un agent chimique détruisant les cellules β du pancréas) chez le rat conduit à un effondrement de l'expression de SREBP1c. Cependant, l'injection d'insuline restaure son expression ([Shimomura et al., 1999](#)). En accord avec ces observations, les cibles connues de SREBP1c (PK, FAS, ACC) ne sont plus induites lorsqu'une forme dominante négative de SREBP1c est exprimée dans des hépatocytes primaires ([Foretz et al., 1999](#)).

L'effet de l'insuline sur l'activation de SREBP1c passe par la PI3K, plusieurs études démontrant l'implication d'Akt/mTORC1 dans cette régulation. Une invalidation hépatospécifique d'Akt2 dans la lignée de souris *ob/ob* provoque une diminution de l'expression de SREBP1c et de ses cibles ([Leavens et al., 2009](#)) tandis que la surexpressions

d'Akt conduit à une suractivation de l'activité transcriptionnelle de SREBP1c (*Fleischmann and Iynedjian, 2000*). De plus, Akt phosphoryle SREBP1c et facilite son export vers l'appareil de Golgi en augmentant l'interaction avec les protéines formant la vésicule de transport (*Yellaturu et al., 2009*). Akt permet également d'inactiver GSK3, dont les phosphorylations peuvent envoyer SREBP1c à la dégradation (*Bengoechea-Alonso and Ericsson, 2009; Dong et al., 2016*). L'induction des gènes de la lipogenèse dépend aussi de mTORC1 (*Li et al., 2010*) via sa cible p70S6 kinase (*Owen et al., 2012*). En diminuant l'expression d'INSIG2, mTORC1 facilite la translocation de SCAP-SREBP1c (*Yecies et al., 2011*). mTORC1 bloque également l'action de lipin-1, une phosphatase qui inhibe l'activité transcriptionnelle de SREBP1c (*Peterson et al., 2011*). L'AMPK quant à elle intervient dans la régulation négative de SREBP1c, puisqu'elle inhibe son activité par phosphorylation dans des conditions de demande énergétique (*Li et al., 2011*), elle bloque mTORC1 en activant un de ses inhibiteurs (*Inoki et al., 2003*) et en phosphorylant une des sous-unités de mTORC1, la protéine Raptor (*Gwinn et al., 2008*).

3. Régulation de SREBP2 par le cholestérol

Lorsque les niveaux de cholestérol sont élevés dans l'hépatocyte, et donc dans la membrane du RE (>5% des lipides totaux), SCAP est lié via son SSD à INSIG. Plus précisément, le cholestérol va induire le changement de conformation du SSD de SCAP et entraîner un changement de conformation permettant la liaison avec INSIG. De la même manière, les oxystérols vont induire un changement de conformation d'INSIG, facilitant la liaison avec SCAP et sa séquestration dans le RE (*Brown and Goldstein, 2009*).

Lorsque la quantité de cholestérol est réduite à moins de 5% des lipides totaux du RE l'hexapeptide MELADL est accessible pour initier la formation de la vésicule de transport. L'absence d'oxystérols ne stabilisant plus INSIG, celui-ci est ubiquitinylé et envoyé à la dégradation (*Gong et al., 2006; Lee et al., 2006*). Il est intéressant de noter qu'INSIG1 est exprimé, puisque c'est une cible de SREBP2, mais continue à être envoyé à la dégradation jusqu'à ce qu'un changement dans la concentration en cholestérol et oxystérols le stabilise et facilite sa liaison avec SCAP (*Gong et al., 2006*).

L'activité transcriptionnelle de SREBP2 peut être régulée également par des modifications post-traductionnelles telles que des acétylations par p300, ce qui augmente son activité, ou par des phosphorylations activatrices et inhibitrices respectivement par les kinases

extracellular signal-regulated kinase (ERK) et AMPK (Luo et al., 2020). Tout comme SREBP1c, SREBP2 est également protégé de l'action de lipin-1 par mTORC1 (Peterson et al., 2011). Il semblerait également que ChREBP conduit à l'ubiquitinylation et dégradation de la forme nucléaire de SREBP2, mais les mécanismes précis n'ont pas encore été élucidés (D. Zhang et al., 2017). De la même manière, la phosphorylation par GSK envoie SREBP2 à la dégradation (Sundqvist et al., 2005).

4. Régulation transcriptionnelle de SREBP1c par LXR

Le promoteur de SREBP1c comporte un SRE (Amemiya-Kudo et al., 2000), mais également deux séquences *LXR response element* (LXRE) (Yoshikawa et al., 2001). D'une part SREBP1c régule sa propre expression, comme le démontre la diminution de ses transcrits dans des souris *Scap*^{-/-} (Matsuda et al., 2001), d'autre part son expression est également dépendante de LXR. En effet, l'ablation des deux isoformes de LXR, LXR α et LXR β , provoque une diminution de l'expression de SREBP1c ainsi que de ses gènes cibles de façon similaire à une souris déficiente en *Srebp1* (Liang et al., 2002; Repa et al., 2000).

C) Facteur de transcription ChREBP

Le facteur de transcription *carbohydrate response element binding protein* (ChREBP) a été mis en évidence par l'étude du *carbohydrate response element* (ChoRE) présent dans le promoteur de la pyruvate kinase (Yamashita et al., 2001). Tout comme les SREBP, c'est une protéine de type bHLHLZ, cependant sa localisation est cytosolique. Son domaine N-terminal comporte deux séquences *nuclear export signal* (NES), et une séquence *nuclear localization signal* (NLS) permettant sa translocation dans le noyau. Son domaine C-terminal contient une région riche en proline, une section bHLHLZ et un segment *leucine zipper-like*, lui permettant d'interagir avec des cofacteurs et de se lier à l'ADN (Ortega-Prieto and Postic, 2019). En réponse au glucose, ChREBP est transloqué dans le noyau suite à sa dimérisation avec son partenaire *Max-like protein X* (MLX), où ils vont induire la transcription de gènes impliqués dans le métabolisme du glucose, mais également celui des acides gras (Ortega-Prieto and Postic, 2019; Stoeckman et al., 2004). En effet, les souris déficientes en *Chrebp* présentent à la fois un défaut d'expression des gènes de la lipogenèse mais aussi de ceux impliqués dans le catabolisme du glucose (Iizuka et al., 2004). Inversement, les souris surexprimant *Chrebp* voient leurs capacités de lipogenèse augmenter (Benhamed et al., 2012).

1. Régulation transcriptionnelle de ChREBP par la glucokinase

En plus du glucose, l'expression de ChREBP dépend également de l'insuline via l'activité de la GK. En effet, une étude révèle qu'en absence de GK hépatique, l'expression de ChREBP n'est pas induite suite à l'ingestion de glucose (*Dentin et al., 2004*). De la même manière, la surexpression de la GK permet de restaurer l'expression de ChREBP chez le rat suite à un traitement à la streptozotocine (*Morral et al., 2007*).

2. Régulation transcriptionnelle de ChREBP par LXR

Il a été démontré que le promoteur de ChREBP contient un LXRE, en faisant ainsi une cible de LXR (*Cha and Repa, 2007*). L'induction de l'activité LXR à l'aide de l'agoniste synthétique T0901317 augmente l'expression de ChREBP, cependant LXR n'est pas l'unique régulateur de ChREBP, puisque son expression est maintenue dans des souris déficientes pour LXR α et LXR β nourries avec un régime hyperglucidique (*Denechaud et al., 2008*).

3. Régulation de l'activité de ChREBP

Lorsque les niveaux de glucose sont faibles, la PKA activée par le glucagon va inactiver ChREBP par une phosphorylation sur la Ser196 et la Thr666. Ainsi, ChREBP peut de lier à la protéine 14.3.3 et rester dans le cytoplasme (*Kawaguchi et al., 2002, 2001*). L'AMPK phosphoryle également ChREBP sur la Ser568 afin de diminuer sa capacité à se lier à l'ADN (*Kawaguchi et al., 2002*). Mais ChREBP est également régulée par les concentrations de certains métabolites qui vont activer ou diminuer son activité. Parmi ceux-ci, on retrouve les corps cétoniques ou l'AMP produits en conditions de jeûne, qui vont stabiliser l'interaction entre ChREBP et 14.3.3 (*Nakagawa et al., 2013; Sakiyama et al., 2008; Sato et al., 2016*). À l'inverse, le G6P facilite la déphosphorylation de ChREBP (*Dentin et al., 2012*). Enfin, ChREBP comporte des domaines qui ont été proposés comme des régions régulatrices de son activité : un *low-glucose inhibitory domain* (LID) et un *glucose response activation conserved element* (GRACE). L'identification d'un motif putatif pour la liaison du G6P sur le domaine GRACE a conduit à l'hypothèse que celui-ci pourrait changer de conformation et se lier plus facilement à des cofacteurs (*McFerrin and Atchley, 2012*). Aussi, lorsque la concentration en glucose est faible, LID inhiberait l'activité de GRACE, et inversement à des niveaux élevés de glucose (*Li et al., 2006*).

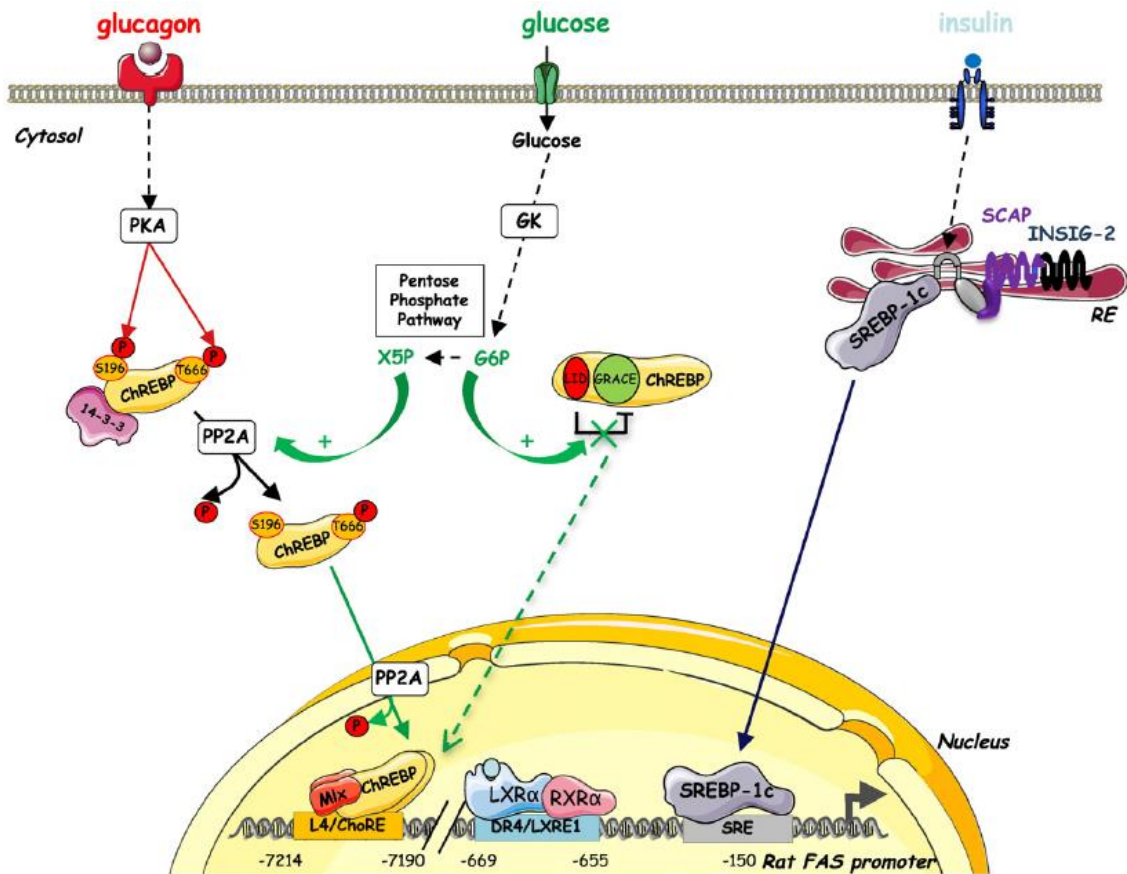


Figure 12. Principales voies de régulation de ChREBP

En réponse à un signal glucagon, la PKA phosphoryle ChREBP sur sa Ser196 et sa Thr666, ce qui lui permet de se dimériser avec son partenaire 14.3.3 et rester dans le cytoplasme. L'absence de glucose permet également l'inhibition intrinsèque du domaine LID sur le domaine GRACE. En présence de glucose, les métabolites de la voie des pentose phosphates, comme le xylulose-5-phosphate, activent la protéine phosphatase 2A (PP2A) qui déphosphoryle ChREBP, ce qui lui permet de se transloquer dans le noyau. Avec son partenaire MLX, il se lie à un élément ChORE. D'après *Poupeau and Postic, 2011*.

D) Récepteur nucléaire LXR

Le récepteur nucléaire LXR a été identifié pour la première fois au cours d'une étude portant sur les récepteurs nucléaires dépendant des hormones (*Apfel et al., 1994; Willy et al., 1995*). L'isoforme LXR α , codée par le gène *Nr1h3*, est majoritairement exprimée dans le foie, le tissu adipeux et les macrophages, tandis que LXR β (*Nr1h2*) est exprimé de manière ubiquitaire (*Repa et al., 2000*). Pour assurer sa fonction de facteur de transcription, il se dimérise avec un autre récepteur de la même famille, le *retinoid X receptor* (RXR), et ensemble ils se lient aux LXRE de leurs gènes cible. L'activité du dimère LXR/RXR est contrôlée par la liaison avec des répresseurs ou activateurs (*Wang and Tontonoz, 2018*). En effet, des corépresseurs de type *silencing mediator of retinoic acid and thyroid hormone receptor* (SMRT) ou *nuclear receptor co-repressor* (NCoR) maintiennent le dimère inactif,

jusqu'à la liaison avec un ligand activateur (*Chen and Evans, 1995; Hörlein et al., 1995*). Parmi les ligands identifiés, on retrouve les oxystérols, mais également certains intermédiaires de la synthèse du cholestérol, tels que le desmostérol (*Janowski et al., 1996; Yang et al., 2006*). Le ligand entraîne un changement de conformation qui libère le corépresseur, permettant ainsi la liaison avec un coactivateur tel que l'*activating signal co-integrator 2* (ASC2) (*Glass and Rosenfeld, 2000*).

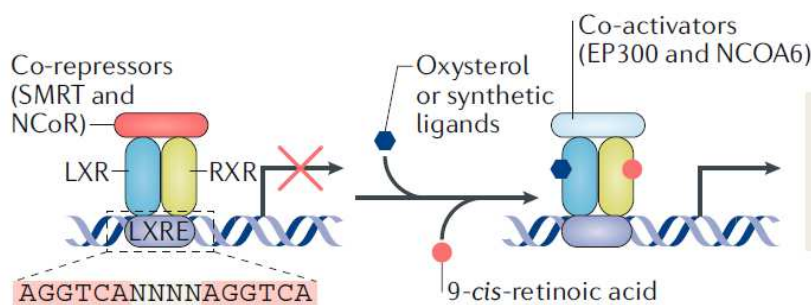


Figure 13. Mécanisme d'activation de LXR

LXR et RXR forment des hétérodimères et se lient aux LXRE dans les régions régulatrices de leurs gènes cibles. En l'absence de ligands, le complexe LXR/RXR se lie aux corépresseurs et empêche l'expression des gènes. Lorsque le dimère est activé par des oxystérols ou des ligands synthétiques, un changement de conformation libère les corépresseurs qui sont remplacés par des coactivateurs, permettant ainsi leur activité transcriptionnelle. ASC2, *activating signal co-integrator 2* ; EP300, *histone acetyltransferase p300* ; NCoR, *nuclear receptor co-repressor* ; SMRT, *silencing mediator of retinoic acid and thyroid hormone receptor*. D'après *Wang and Tontonoz, 2018*.

1. Régulation de LXR

L'activité de LXR dépend fortement de l'abondance des oxystérols, et plusieurs études ont montré le lien étroit entre ces deux acteurs. Dans un modèle murin d'inactivation des enzymes majeures de la synthèse du cholestérol, CYP46A1, CYP27A1 et la cholestérol 25-hydroxylase (Ch25H), l'activité de LXR est effondrée à la suite d'un régime riche en cholestérol, et son activité est restaurée grâce à l'agoniste synthétique T0901317 (*Chen et al., 2007*). Par ailleurs, l'équilibre entre régulation de la synthèse du cholestérol par LXR et régulation de l'activité de LXR par cette voie a été mis en évidence grâce aux souris *Srebp2*^{-/-}. Ainsi, l'absence de ce facteur de transcription provoque une forte diminution de l'activité de LXR, avec des conséquences sur l'expression des acteurs de la lipogenèse, dont SREBP1c (*Rong et al., 2017*).

Mais la modulation de l'activité de LXR peut également se faire via des phosphorylations. En effet, la PKA phosphoryle les Ser195, 196, 290 et 291, localisées dans les domaines de

liaison au ligand et de dimérisation de LXR. Ainsi, la diminution de la liaison à l'ADN et de la dimérisation avec RXR sont associées à une augmentation du recrutement du corépresseur NCoR1 conduisant à l'inactivation de LXR lorsque la concentration en glucagon est élevée (*Yamamoto et al., 2007*). Il semblerait également que l'AMPK peut phosphoryler LXR afin d'inhiber son activité, tandis que la voie mTORC/p70S6 kinase conduirait à une phosphorylation activatrice (*Hwahng et al., 2009*).

Enfin, il existerait un mécanisme de répression de LXR par NFE2L1 dans des conditions de faible abondance de cholestérol (*Widenmaier et al., 2017*), cependant les mécanismes régissant cette régulation restent à déterminer.

2. Régulation de la lipogenèse via SREBP1c

Comme décrit précédemment, SREBP1c est transcriptionnellement dépendant de LXR. Leur rôle commun dans la régulation de la lipogenèse a été mis en évidence grâce à des souris *Nr1h2/3^{-/-}* présentant le même phénotype de lipogenèse réduite que des souris *Srebp1^{-/-}* (*Repa et al., 2000*). En effet, LXR contrôle l'expression de FAS (*Joseph et al., 2002*), ACC (*Talukdar and Hillgartner, 2006*) et SCD1 (*Chu et al., 2006*), et l'induction de LXR à l'aide du T0901317 provoque une forte synthèse de lipides, de triglycérides et une sécrétion de VLDL élevée (*Schultz et al., 2000*). Mais LXR agirait également sur la transduction du signal insulinique qui permet d'induire SREBP1c, puisque la délétion du LXRE présent dans le promoteur de SREBP1c annule les effets positifs de l'insuline sur son expression (*Chen et al., 2004*). De plus, en surexprimant la cholestérol sulfotransférase dans des hépatocytes primaires afin d'inhiber de la synthèse d'oxystérols, ce défaut d'expression de SREBP1c est reproduit (*Chen et al., 2007*). Il a été suggéré que LXR et CCAAT/enhancer-binding protein β (C/EBP β) formeraient un complexe qui, sous l'effet de l'insuline, induirait l'expression de SREBP1c (*Tian et al., 2016*). Outre son action sur l'expression de SREBP1c, LXR pourrait également influencer sa maturation. La lysophosphatidylcholine acyltransférase 3 (LPCAT3) est l'enzyme responsable de l'incorporation de PUFA dans les phospholipides membranaires, et son expression est modulée par LXR. Ainsi, en altérant la composition membranaire du RE, LXR favoriserait la maturation et l'export de SREBP1c (*Demeure et al., 2011; Rong et al., 2013*).

3. Régulation du métabolisme du cholestérol

Comme abordé précédemment, l'homéostasie du cholestérol est assurée par l'équilibre entre synthèse et catabolisme. SREBP2 est le facteur régulant la synthèse, conduisant ainsi à la génération d'oxystérols activateurs de LXR (*Rong et al., 2017*), qui en retour induit le catabolisme et l'export du cholestérol.

Les transporteurs ABCA1 et ABCG1 permettant le transfert du cholestérol vers les HDL sont sous la dépendance de LXR (*Costet et al., 2000; Kennedy et al., 2001*). ABCA1 est essentiel dans les macrophages, puisqu'il évite la conversion de ces derniers en *foam cells*, réduisant ainsi les risques d'athérosclérose (*Fitzgerald et al., 2010*). Sa régulation par LXR pourrait se faire à travers un long ARN non-codant MeXis (*macrophage-expressed LXR-induced sequence*) récemment mis en évidence (*Sallam et al., 2018*). Par ailleurs, l'ubiquitine-ligase IDOL, responsable de l'envoi à la dégradation du LDL, est également une cible de LXR (*Zelcer et al., 2009*).

Le rôle de LXR dans la synthèse des acides biliaires a été mis en évidence dans un modèle murin *Nr1h3^{-/-}*, où le cholestérol s'accumule suite à un régime hypercholestérolémiant car l'expression de CYP7A1 n'est pas induite (*Peet et al., 1998*). ABCG5 et ABCG8, les transporteurs excréant le cholestérol dans les acides biliaires dépendent de LXR, puisque la stimulation avec du T0901317 ne permet pas l'élimination du cholestérol dans des souris doublement délétées pour ces 2 transporteurs (*Yu et al., 2003*).

Enfin, une étude récente a identifié un long ARN non-codant dénommé LeXis (*liver-expressed LXR-induced sequence*), qui serait capable de se lier au cofacteur RALY impliqué dans l'expression des gènes de la biosynthèse du cholestérol, et ainsi bloquer leur transcription (*Sallam et al., 2016*). LXR pourrait également induire l'expression de RNF145 qui phosphoryle SCAP, empêchant ainsi la formation des vésicules d'export vers l'appareil de Golgi (*L. Zhang et al., 2017*).

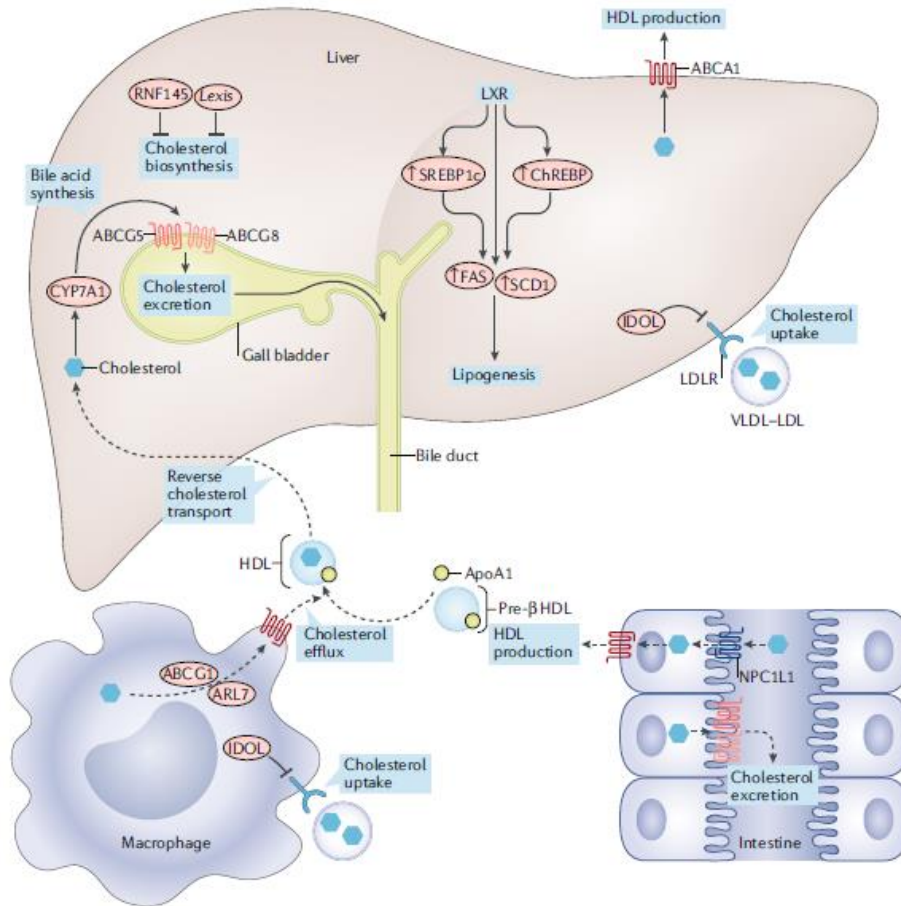


Figure 14. LXR régule le métabolisme des lipides et du cholestérol

L'activation de LXR module le métabolisme du cholestérol et des acides gras. Les cibles de LXR sont indiquées en rouge. Dans le foie, l'activation de LXR favorise la conversion du cholestérol en acides biliaires via CYP7A1 et son excrétion via ABCG5 et ABCG8. LXR inhibe l'absorption du cholestérol dans le foie et les macrophages en induisant l'expression d'IDOL et la dégradation du LDLR. L'activation de LXR favorise la lipogenèse de novo en induisant l'expression de SREBP1c, ChREBP et de leurs cibles, FAS et SCD1. Dans les cellules périphériques telles que les macrophages, LXR induit l'expression d'ABCA1 et ABCG1, favorisant ainsi l'efflux de cholestérol vers ApoA1 dans les pré-HDL. Dans l'intestin, LXR inhibe également l'absorption du cholestérol en inhibant indirectement NPC1L1. Les flèches en pointillés indiquent une réduction de l'absorption du cholestérol. D'après Wang and Tontonoz, 2018.

CHAPITRE II : LES MALADIES STÉATOSIQUES NON-ALCOOLIQUES DU FOIE

Avec l'amélioration de la qualité de vie dans les pays industrialisés sont apparues de nouvelles affections hépatiques liées à une mauvaise alimentation, regroupées sous l'appellation de maladies stéatosiques non-alcooliques du foie, ou *non-alcoholic fatty liver diseases* (NAFLD). Elles ont été décrites pour la première fois aux États-Unis en 1980 suite à une étude démontrant que les lésions hépatiques observées n'étaient pas dues à une consommation excessive d'alcool, mais bel et bien à une surcharge lipidique (*Ludwig et al., 1980*). Depuis, de nombreuses études ont permis de révéler les mécanismes de la mise en place de cette pathologie, l'étroite collaboration entre déséquilibre métabolique et inflammation, et comment cela peut conduire à l'émergence de cancers.

I. Les NAFLD : une épidémie moderne

A) Épidémiologie

L'étude épidémiologique des NAFLD reste encore difficile, car l'Organisation Mondiale de la Santé ne les a pas encore reconnues comme maladies non-transmissibles, et la source de statistiques la plus fiable reste encore la méta-analyse (*Younossi et al., 2023b*). La dernière en date a estimé une prévalence mondiale de 30% parmi la population adulte (25% en Europe occidentale) en se basant sur les études effectuées entre 1990 et 2019, et jusqu'à 38% en considérant seulement les données de 2016 à 2019 (*Younossi et al., 2023a*). Des études de modélisation prévoient une augmentation constante de la prévalence des NAFLD, passant de 83,1 millions de cas en 2015 à 100,9 millions en 2030 aux États-Unis (*Estes et al., 2018*). De manière alarmante, la prévalence pédiatrique mondiale des NAFLD est estimée à 5-10% (*Yu and Schwimmer, 2021*). Enfin, aux États-Unis, les NAFLD sont devenues la seconde cause de transplantation hépatique (*Younossi et al., 2021*), ce qui permet de les qualifier de véritable épidémie.

B) Comorbidités

Les NAFLD sont un spectre de pathologies avec diverses comorbidités pouvant favoriser leur progression. Les facteurs de risques principaux font partie du syndrome métabolique, comme l'obésité ou la dyslipidémie, les maladies cardiovasculaires, et le diabète de type 2. Il est estimé que 51% des patients NAFLD sont obèses, et 78% développent un diabète de type 2 ([Anstee et al., 2013](#)). De plus, les maladies cardiovasculaires sont la principale cause de décès chez les patients NAFLD, alors que les dysfonctionnements hépatiques la troisième seulement ([Lindenmeyer and McCullough, 2018](#)). D'autres affections telles que certaines maladies rénales chroniques ([Byrne and Targher, 2020](#)), le syndrome des ovaires polykystiques ([Kumarendran et al., 2018](#)) ou encore l'hypothyroïdisme ([Z. Guo et al., 2018](#)) ont été associées aux NAFLD.

C) Progression pathologique

Les NAFLD se déclinent en plusieurs stades dont la progression dépend de facteurs patient-dépendants (génétique, microbiote, présence de comorbidités) et environnementaux. Le premier stade est l'accumulation de lipides dans le foie, appelée stéatose. Elle peut être transitoire, comme lors d'une période de jeûne prolongé, alimentée par la lipolyse du tissu adipeux afin de permettre au foie de produire de l'énergie. Dès que la contrainte métabolique est levée, tous les lipides accumulés par le foie sont utilisés ou exportés de nouveau vers le tissu adipeux. La stéatose peut également être chronique, notamment du fait d'une alimentation chargée en lipides, lorsque le stockage dans le tissu adipeux n'est plus suffisant. Lorsque le parenchyme hépatique devient inflammé de manière chronique, on parle de stéatohépatite, ou *non-alcoholic steatohepatitis* (NASH) qui peut à terme évoluer en cirrhose, ou être un terrain favorable pour l'émergence d'un carcinome hépatocellulaire (CHC) ([Friedman et al., 2018](#)).

Toutefois, la progression vers des stades plus graves reste restreinte. Une étude a effectué un suivi de la progression d'une cohorte de patients comprenant divers stades de NAFLD sur une durée moyenne de 7 ans, et a montré que seulement 44% des patients stéatosiques ont progressé vers la NASH ([McPherson et al., 2015](#)). De plus, la progression vers la fibrose ne se fait que dans 20% des cas à partir d'un fond NASH, mais également sur un fond stéatosique ([Singh et al., 2015](#)). Ces études montrent aussi que la régression est possible, mais

limitée à des stades de fibrose peu avancée. Quant à l'émergence du CHC, elle a lieu dans 2,8% des cas sur un fond NASH cirrhotique comparativement à 4% pour une cirrhose due à une infection virale d'après une étude ayant suivi des patients (Ascha *et al.*, 2010), et dans 38% des cas sur fond NASH sans cirrhose d'après une méta-analyse (Stine *et al.*, 2018). L'évaluation des CHC dérivés directement à partir d'un foie stéatosique reste difficile, car le dépistage de la stéatose n'est pas fréquent, et certaines études incluent dans cette catégorie les cirrhoses d'origine inconnue, ce qui introduit un biais (Huang *et al.*, 2021). Toutefois, une étude britannique a mis en évidence une augmentation de l'incidence de CHC sous fond stéatosique, avec une proportion de patients inférieure à 10% en 2000 passant à 34,8% en 2010 (Dyson *et al.*, 2014). Il est intéressant de noter que cette cohorte comprenait 20,4% de cas de CHC d'origine indéterminée en raison de l'absence de pathologie hépatique chronique, parmi lesquels 48,4% présentaient au moins un facteur de risque métabolique.

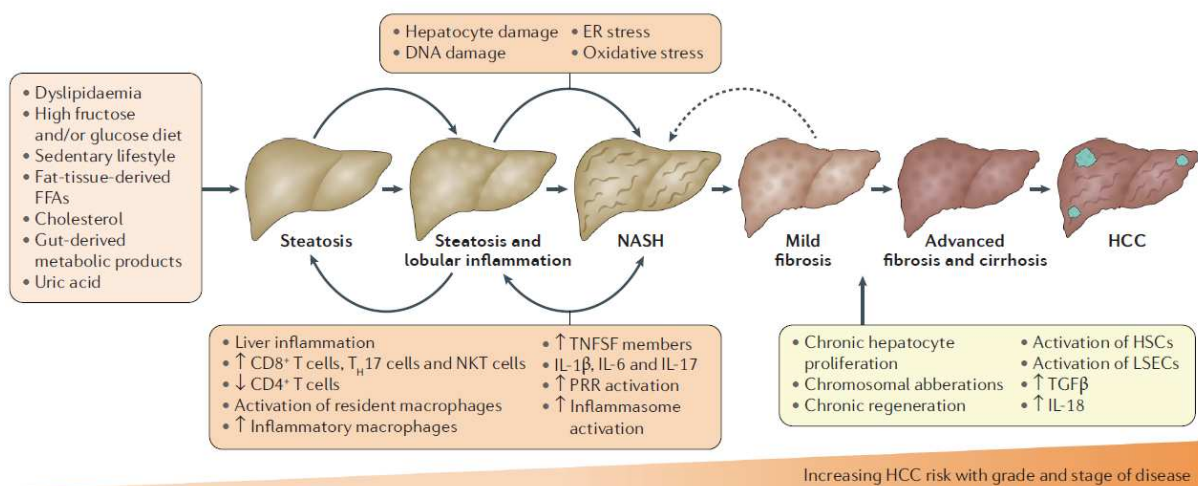


Figure 15. Les différents stades des NAFLD avec différents facteurs causaux

La surcharge hépatique en métabolites résultant de l'alimentation associée à un mode de vie sédentaire sont des facteurs majeurs du développement des NAFLD. Les acides gras libres peuvent s'accumuler sous forme de stéatose et favoriser l'inflammation. Les perturbations métaboliques et les processus inflammatoires facilitent la transition de la stéatose à la NASH. En fonction des réponses au traitement et des changements de mode de vie, ces états pathologiques sont, dans une certaine mesure, réversibles. Mais si le stress métabolique et inflammatoire persiste, la mort cellulaire et les cycles de prolifération compensatoire au cours de la NASH contribuent au risque d'émergence du CHC. D'après Anstee *et al.*, 2019.

Historiquement, les NAFLD ont été décrites comme la résultante d'un premier déséquilibre d'ordre métabolique, c'est-à-dire l'accumulation excessive de lipides par les hépatocytes à l'origine de la stéatose, puis d'un deuxième évènement inflammatoire favorisant la transition vers la NASH (Day and James, 1998). Il est aujourd'hui clair, à la lumière des nombreuses études ayant exploré le sujet, que les NAFLD découlent d'un

dysfonctionnement à plusieurs niveaux, faisant intervenir le tissu adipeux, les intestins ou encore le muscle, ainsi que de nombreuses voies moléculaires telles que l'inflammation, le stress mitochondrial ou du RE de manière concomitante (*Buzzetti et al., 2016*). Malgré l'imbrication de tous ces facteurs, ils seront décrits de manière indépendante dans la suite de ce chapitre.

II. Développement de la stéatose hépatique

On considère qu'un foie est stéatosique si plus de 5% des hépatocytes présentent une accumulation cytoplasmique de lipides. La stéatose peut être facilement prise en charge par une adaptation du régime alimentaire afin de décroître les apports en lipides. Dans le cas contraire, le déséquilibre entre l'absorption excessive d'acides gras et de glucose et les capacités du foie à les cataboliser et exporter induit un stockage important de triglycérides dans les gouttelettes lipidiques.

A) Adaptation du foie face à une surcharge d'acides gras

L'ingestion d'un surplus de lipides va perturber l'homéostasie hépatique, et le foie va mettre en place des mécanismes pour pallier ce déséquilibre. De manière intéressante, une étude chez des patients obèses a révélé que les TAG hépatiques étaient constitués à seulement 15% d'acides gras issus de l'alimentation (*Donnelly et al., 2005*).

1. Stockage sous forme de gouttelettes lipidiques

Il existe plusieurs catégories de gouttelettes en fonction de leur localisation cellulaire : les gouttelettes nucléaires, cytoplasmiques et luminales (*Zadoorian et al., 2023*). Les plus courantes et les plus décrites sont les gouttelettes cytoplasmiques, qui bourgeonnent à partir du RE, le site de synthèse des TAG, et peuvent être entourées de plusieurs protéines telles que les périlipines (PLIN) ou *fat storage-inducing transmembrane protein 2* (FIT2) (*Zadoorian et al., 2023*). Dans le cas de la stéatose, on distingue deux formes de gouttelettes dans les hépatocytes : la stéatose macro-vésiculaire est formée par des grandes gouttelettes qui déforment l'organisation intracellulaire et poussent le noyau contre la membrane, et la stéatose micro-vésiculaire correspond à l'agencement de plusieurs gouttelettes sous forme de grappes sans affecter la position du noyau (*Takahashi, 2014*). En ce qui concerne les NAFLD, la stéatose micro-vésiculaire n'est présente que dans 10% des cas, et est fortement

corrélée avec la progression vers la NASH (*Tandra et al., 2011*). De manière intéressante, l'expression de PLIN2 et PLIN3 est augmentée chez les patients stéatosiques, tandis que PLIN1 est fortement induite dans la NASH (*Carr and Ahima, 2016*). De plus, dans des modèles murins, la délétion de PLIN2 protège de la stéatose induite par un régime riche en lipides, et réduit l'expression de gènes intervenant dans le métabolisme des acides gras (*Imai et al., 2012, 2007*). La délétion de PLIN5 quant à elle provoque une augmentation de la lipolyse et de l'oxydation des acides gras due à une forte biogenèse des mitochondries et une capacité d'oxydation accrue. Cependant, les hépatocytes présentent des lésions dues à la peroxydation des lipides, soulignant l'importance de PLIN5 dans la protection contre la lipotoxicité (*Wang et al., 2015*).

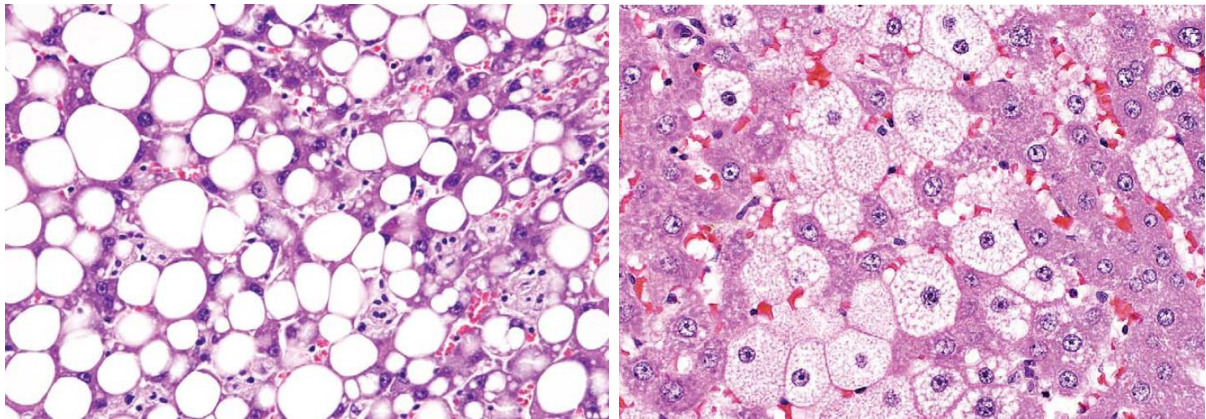


Figure 16. Histologie de la stéatose hépatique

Coupes histologiques avec coloration hémalum et éosine de foies de rat (gauche) et de souris (droite) représentant respectivement la stéatose macro-vésiculaire et micro-vésiculaire. D'après *Thoolen et al., 2010*.

2. Sécrétion via les VLDL

Une autre composante de la stéatose est l'altération de l'export des acides gras par les hépatocytes à l'aide des VLDL. En effet, les patients NAFLD présentent une sécrétion accrue de VLDL due à une insulino-résistance qui favorise la lipolyse du tissu adipeux et l'export, et réduit le stockage (*Heeren and Scheja, 2021*). Cependant l'export de TAG par les VLDL atteint un plateau à partir d'un certain seuil de stéatose, et ne peut plus compenser la synthèse de TAG par les hépatocytes (*Fabbrini et al., 2008; Lytle et al., 2019*). Lorsque la stéatose dépasse 30% du parenchyme hépatique, l'expression de *MTTP* et *APOB*, qui jusque-là était induite, va diminuer (*Higuchi et al., 2011*). De plus, l'expression d'*APOB* semble dépendante du stress du RE induit par l'accumulation de certains lipides tels que les acides oléiques (C18:0) ou palmitiques (C16:0) (*Caviglia et al., 2011*).

Il existe par ailleurs certains variants génétiques responsables de la modulation de la sécrétion de VLDL favorisant le développement des NAFLD. L'un d'entre eux concerne la protéine *transmembrane 6 superfamily 2* (TM6SF2), dont la fonction exacte n'a pas encore été élucidée, mais qui pourrait participer à l'adressage des pré-VLDL du RE vers le Golgi (Luo et al., 2022). Les patients présentant la mutation Glu167Lys ont des taux sériques de transaminases (ASAT/ALAT) plus élevés, associés à une diminution de TAG circulants et de LDL-cholestérol mais une accumulation de TAG hépatiques (Kozlitina et al., 2014). De plus, l'inhibition de l'expression de l'allèle non-muté à l'aide d'un siRNA dans des lignées d'hépatocytes humains provoque une augmentation du contenu en TAG intracellulaire et une diminution de leur sécrétion, tandis que sa surexpression provoque l'effet inverse (Mahdessian et al., 2014), démontrant l'importance de l'intégrité de cette protéine pour le bon assemblage des VLDL.

3. Lipogenèse de novo

Au premier abord, il peut sembler contre-intuitif que le foie synthétise des acides gras alors qu'il doit faire face à un afflux constant de lipides. En effet, l'expression des gènes de la lipogenèse est induite chez les patients NAFLD (Kohjima et al., 2007). De plus, 26% des TAG hépatiques contiennent des acides gras provenant de la lipogenèse (Donnelly et al., 2005). Cette dérégulation s'explique par la mise en place d'une insulino-résistance sélective qui favorise l'activation des facteurs de transcription SREBP1c et ChREBP (Chavez and Summers, 2010). De plus, ce processus conduit à la synthèse d'espèces lipotoxiques telles que le palmitate, facilitant l'émergence de l'inflammation (Listenberger et al., 2003). Cependant, il existe des évidences concernant le rôle hépato-protecteur de la lipogenèse, puisque la désaturation des acides gras par SCD1, qui est une cible de ChREBP, protège les hépatocytes contre l'apoptose (Li et al., 2009). Par ailleurs, l'inhibition de la synthèse des TAG par le blocage de la DGAT provoque une amélioration de la stéatose mais une exacerbation de l'inflammation et de la fibrose dans un contexte de régime *methionine and choline deficient high fat diet* (MCD) permettant de reproduire la NASH (Yamaguchi et al., 2007).

4. Oxydation des acides gras

L'étude de la β -oxydation chez les patients a produit des résultats contradictoires. En effet, elle pourrait être induite afin compenser l'accumulation d'acides gras (Dasarathy et al., 2011), réduite (Crocì et al., 2013) ou rester inchangée (Kotronen et al., 2009) chez les patients

NAFLD. Cette variabilité pourrait s'expliquer par le stade pathologique pris en compte dans l'étude, puisque l'efficacité de l'oxydation pourrait évoluer avec la progression des NAFLD. De plus, comme décrit dans le **Chapitre I**, la lipogenèse *de novo* et la β -oxydation sont mutuellement exclusives. Parallèlement à une augmentation de l'expression des gènes de la lipogenèse, on observe également une augmentation de l'expression des gènes de la β -oxydation, cependant CPT1 est réduit (*Kohjima et al., 2007*), suggérant une tentative des hépatocytes de métaboliser le surplus d'acides gras, mais des mécanismes régulateurs interviennent et bloquent cette voie.

Toutefois, les mitochondries sont affectées par le stress oxydatif découlant du surplus d'acides gras (*Ipsen et al., 2018*). En effet, celui-ci déclenche d'autres types d'oxydation tels que l' ω -oxydation, permettant l'élimination de lipides toxiques, mais qui génère des ROS (*Ipsen et al., 2018*). Par ailleurs, il a été montré que des dysfonctionnements mitochondriaux apparaissent avant même l'installation de la stéatose dans un modèle de rats hyperphagiques (*Rector et al., 2010*). De plus, une altération des capacités respiratoires des mitochondries augmente la susceptibilité pour la stéatose dans un modèle de rat (*Matthew Morris et al., 2014*). Chez les patients, on observe une augmentation de la respiration mitochondriale dans les cas d'obésité avec ou sans stéatose, sans modification du nombre de mitochondries, tandis que chez les patients NASH, malgré une augmentation du nombre de mitochondries, les capacités de respiration sont 31 à 40% plus faibles, et associées à un stress oxydant (*Koliaki et al., 2015*).

B) Développement de l'insulinorésistance

L'insuline étant essentielle pour la régulation du métabolisme du glucose mais également celui des lipides, son action est perturbée lors du développement de la stéatose. L'insulinorésistance correspond à une diminution des effets de l'insuline sur ses cibles, comme le foie, le muscle ou le tissu adipeux, malgré une sécrétion accrue par le pancréas. On observe alors une hyperglycémie associée à une hyperinsulinémie.

1. Insulinorésistance du tissu adipeux

En conditions physiologiques, l'insuline inhibe la lipolyse du tissu adipeux en bloquant la phosphorylation de l'HSL et de PLIN1, cette dernière aidant à la stabilisation de l'ATGL à la surface des gouttelettes lipidiques. Lorsque l'insuline n'a plus d'effet sur le tissu adipeux,

l'ATGL et l'HSL sont actives et permettent la libération d'acides gras dans la circulation (*Petersen and Shulman, 2018*). La lipolyse due à l'insulinorésistance est la source majeure d'acides gras dans la stéatose, puisque 59% des TAG hépatiques contiennent des acides gras non-estérifiés provenant du tissu adipeux (*Donnelly et al., 2005*). Toutefois, il a été observé dans des souris lipodystrophiques une insulinorésistance hépatique et musculaire sévère, ainsi que de la stéatose et une accumulation ectopique de TAG au niveau musculaire. La transplantation d'adipocytes a rétabli la sensibilité à l'insuline, et a permis une réversion de la stéatose, soulignant le rôle protecteur du tissu adipeux dans le stockage des acides gras et dans l'homéostasie insulinémique (*Kim et al., 2000*). De même, les patients souffrant de lipodystrophie présentent une insulinorésistance et de la stéatose, mais des traitements avec la leptine, l'hormone régulant la satiété, permettent d'améliorer leur diagnostic (*Petersen et al., 2002*).

Un facteur majeur de l'insulinorésistance du tissu adipeux est l'inflammation. En effet, l'expression du *tumor necrosis factor α* (TNF α) dans le tissu adipeux a été corrélée avec l'obésité et l'insulinorésistance dans plusieurs modèles de rongeurs (*Hotamisligil et al., 1993*) et également chez les patients (*Hotamisligil et al., 1995*). Les souris *Tnf α ^{null}* nourries avec un régime riche en gras et en carbohydrates développent de l'obésité mais ne présentent pas d'insulinorésistance (*Uysal et al., 1997*). Il a été proposé que le TNF α active la *c-Jun NH2-terminal kinase 1* (JNK1), qui phosphoryle IRS1 sur sa Ser307 et inhibe ainsi la transduction du signal de l'insuline (*Aguirre et al., 2000*). En effet, il a été montré que l'activité de JNK corréle avec une augmentation de l'insulinorésistance dans des modèles génétiques et alimentaires d'obésité (*Hirosumi et al., 2002*). De plus, un modèle *Jnk^{-/-}* spécifique du tissu adipeux a révélé une baisse de l'insulinorésistance hépatique associée à une absence de stéatose quand ces souris sont soumises à un régime (*Sabio et al., 2008*). Cependant, un *knock-in* d'une forme d'IRS1 contenant la mutation Ser307Ala, qui lui confère une activation permanente, conduit à une insulinorésistance sévère des souris nourries avec du régime gras (*Copps et al., 2010*).

2. Insulinorésistance du foie

Dans la progression de la stéatose, le foie est affecté par une insulinorésistance sélective. En effet, la néoglucogénèse n'est plus inhibée, ce qui conduit à une accumulation de glucose endogène en plus de celui apporté par l'alimentation, tandis que la lipogénèse continue à être activée (*Petersen and Shulman, 2018*). Chez les patients diabétiques avec ou sans

stéatose, la néoglucogenèse est élevée et ils présentent une hyperglycémie à jeun (*Gastaldelli et al., 2000*). Toutefois, l'insuline n'étant pas l'unique régulateur de la néoglucogenèse, puisque celle-ci dépend de l'équilibre oxydant, la disponibilité des substrats, des modifications post-traductionnelles *etc.*, plusieurs hypothèses ont été émises pour expliquer cette sélectivité de l'insulinorésistance (*Petersen and Shulman, 2018*).

La première hypothèse concerne l'état de phosphorylation d'Akt qui influencerait sur son niveau d'activité. En effet, comme décrit dans le **Chapitre I**, la phosphorylation d'Akt par la PI3K sur sa Thr308 permet d'activer la lipogenèse en inhibant le répresseur de mTORC1. Or, Akt inhibe également le facteur de transcription responsable de la néoglucogenèse, à savoir *Forkhead box protein O1* (FOXO1) (*Petersen et al., 2017*). Il a été montré que la phosphorylation de la Ser473 d'Akt par mTORC2 est indispensable pour son action inhibitrice sur FOXO1, mais que la phosphorylation de la Thr308 d'Akt suffit pour activer mTORC1 (*Jacinto et al., 2006*). Or, dans un modèle de souris db/db stimulés à l'insuline, Akt est phosphorylée sur la Thr308 mais pas sur la Ser473, suggérant que le maintien de la néoglucogenèse serait dû à la mauvaise régulation par Akt (*Wu and Williams, 2012*). Cette différence de phosphorylation d'Akt pourrait s'expliquer par une sensibilité à l'insuline différente, puisque des hépatocytes primaires stimulés par une dose fixe d'insuline nécessitent 4 fois plus d'inhibiteur de l'IR pour induire l'activation de la néoglucogenèse que pour inhiber la lipogenèse *de novo* (*Cook et al., 2015*). Cependant, d'autres analyses mécanistiques sont indispensables pour explorer cette hypothèse, en raison de la difficulté à éliminer les interférences des autres voies métaboliques dans lesquelles interviennent les différents acteurs.

Une autre hypothèse suggère une activation de la lipogenèse indépendante de l'insuline provoquée par l'abondance de métabolites issus de la suralimentation. En effet, l'activation de ChREBP peut se faire grâce au G6P et à d'autres métabolites en lien avec le glucose (*Ortega-Prieto and Postic, 2019*). De plus, les souris LIRKO présentent une expression hépatique de SREBP1c, que ce soit sous un régime standard ou enrichi en fructose, cependant pas au même niveau qu'une souris *wild-type* (*Haas et al., 2012*). Il existe donc des voies d'activation de SREBP1c indépendantes de l'insuline.

Enfin, plusieurs médiateurs lipidiques ont été montrés comme intervenant dans la régulation de la signalisation insulinodépendante. En effet, l'accumulation de DAG

provoque la translocation de la protéine kinase C ϵ (PKC ϵ) à la membrane, où elle peut interférer avec l'activité kinase du domaine intracellulaire de l'IR et ainsi empêcher la transduction du signal (Perry et al., 2014). Le blocage spécifique de la traduction de PKC ϵ restaure la sensibilité à l'insuline dans des rats nourris pendant 3 jours avec un régime riche en gras alors que la quantité de DAG reste inchangée (Samuel et al., 2007). De même, les souris *Prkce*^{-/-} nourries avec un régime riche en gras développent de la stéatose sans insulino-résistance (Raddatz et al., 2011). Chez l'Homme, le contenu hépatique en DAG a été montré comme étant le meilleur facteur de prédiction de l'insulino-résistance chez les patients obèses (Kumashiro et al., 2011). Les céramides sont également connus pour leur participation à la résistance à l'insuline (Summers et al., 2019). Ce sont les précurseurs des sphingolipides qui, avec les phospholipides, constituent les membranes cellulaires. Ils sont issus de la condensation d'une molécule de sérine avec un palmitoyl-CoA, puis de l'ajout d'une deuxième chaîne carbonée plus ou moins longue par une céramide synthase (Hajdúch et al., 2021). Les céramides peuvent activer la PKC ζ qui phosphoryle Akt sur sa Thr34/Ser34, ce qui provoque sa séquestration dans des cavéoles membranaires et empêchant la signalisation insulinique (Powell et al., 2003). Dans les cellules ne possédant pas de cavéoles, comme c'est le cas des hépatocytes (Calvo et al., 2001), la protéine phosphatase 2 A (PP2A) est activée par les céramides et déphosphoryle Akt (Cazzolli et al., 2001). Le blocage de la synthèse des céramides à l'aide de la fenretinide, un rétinoïde de synthèse, restaure la sensibilité à l'insuline dans plusieurs modèles cellulaires et *in vivo* de surcharge lipidique (Bikman et al., 2012).

3. Stéatose et insulino-résistance

Dans la pathologie humaine, la stéatose et la résistance à l'insuline vont souvent de pair. Cependant, comme exploré précédemment, le lien de causalité entre stéatose et insulino-résistance reste une question complexe. Dans plusieurs modèles, il a été montré que la stéatose pouvait survenir sans insulino-résistance : les souris surexprimant DGAT2, celles invalidées de MTTP, ou encore celles qui surexpriment ChREBP développent une stéatose mais maintiennent une sensibilité à l'insuline (Benhamed et al., 2012; Minehira et al., 2008; Monetti et al., 2007). De plus, la nature des acides gras contenus dans les gouttelettes lipidiques semble intervenir dans l'émergence de l'insulino-résistance. En effet, la surexpression de ChREBP induit SCD1, ce qui favorise la conversion des SFA en MUFA (Benhamed et al., 2012). L'invalidation de l'ELOVL6 quant à elle améliore la sensibilité à l'insuline dans un contexte de régime riche en gras sans affecter la stéatose, grâce à

l'accumulation d'acide palmitoléique (*Matsuzaka et al., 2007*). Chez les patients, des études montrent que l'augmentation des apports en MUFA via l'alimentation a des effets positifs sur l'insulinosensibilité (*Johns et al., 2020; Paniagua et al., 2007*). De la même manière, la présence d'acide palmitoléique dans le sérum de patients non-diabétiques est associée avec une meilleure sensibilité à l'insuline (*Tricò et al., 2020*).

4. Insulinorésistance et stress du réticulum endoplasmique

Le réticulum endoplasmique concentre plusieurs processus cellulaires, notamment la régulation de la conformation et de la maturation protéique, la synthèse de stérols, l'assemblage de VLDL et la synthèse des différents constituants membranaires. Dans un contexte de stress, c'est-à-dire une accumulation excessive de protéines dont le repliement est non-conforme, le RE déclenche l'*unfolded protein response* (UPR) (*Wang and Kaufman, 2016*). L'initiation de l'UPR dépend de l'*inositol-requiring enzyme 1* (IRE1), de la *PKR-like ER kinase* (PERK) et de l'*activating transcription factor 6* (ATF6), trois protéines résidentes de la membrane du RE (*Lebeaupin et al., 2018*). En absence de stress, ces trois acteurs sont maintenus inactifs par leur liaison avec la *glucose-regulated protein 78* (GRP78), mais au-delà d'un certain seuil de protéines peu ou mal repliées, GRP78 se détache et permet l'initiation des différentes branches de l'UPR (*Lebeaupin et al., 2018*).

Dans le cas des NAFLD, il a été montré que les marqueurs de l'UPR sont exprimés dans un modèle murin de stéatose induite avec un régime riche en gras, ce qui provoque une augmentation de l'activité de JNK (*Özcan et al., 2004*). Chez des patients ayant subi une chirurgie bariatrique, la perte de poids est associée à une amélioration de l'insulinorésistance et une diminution des marqueurs de stress du RE ainsi qu'une baisse d'activité de JNK (*Gregor et al., 2009*). Par ailleurs, *X-box protein 1* (XBP1), le facteur de transcription activé par IRE1, semble impliqué dans la signalisation insulinémique. En effet, les souris *Xbp1^{+/-}* nourries avec du HFD présentent une hyperglycémie et une hyperinsulinémie (*Özcan et al., 2004*), et les souris *Xbp1^{Δhep}* voient leur expression des gènes de la lipogenèse diminuer (*Lee et al., 2008*). Cette dernière étude a également montré la capacité de XBP1 à se lier aux promoteurs de DGAT2, SCD1 et ACC2. De plus, l'absence d'XBP1 provoque le *regulated IRE1-dependent decay* (RIDD), où IRE1 exécute son activité d'endoribonucléase, ciblant notamment les ARNm des gènes impliqués dans la lipogenèse (*So et al., 2012*). Cependant, l'invalidation d'IRE1 provoque l'effet inverse, soit le développement d'une stéatose importante, causée par l'absence de répression d'IRE1 sur

l'expression des régulateurs positifs de la lipogenèse (Zhang *et al.*, 2011). Chez les souris ob/ob, db/db et les modèles murins d'obésité alimentaire, l'expression de *Bax inhibitor 1* (BI1), protéine régulatrice d'IRE1, est fortement réduite. Cependant, sa réexpression améliore la sensibilité à l'insuline (Bailly-Maitre *et al.*, 2010). La délétion hépatospécifique d'IRE1 provoque un défaut d'assemblage des VLDL en affectant l'activité de la *protein disulfide isomerase* (PDI), un partenaire de MTTP (Wang *et al.*, 2012).

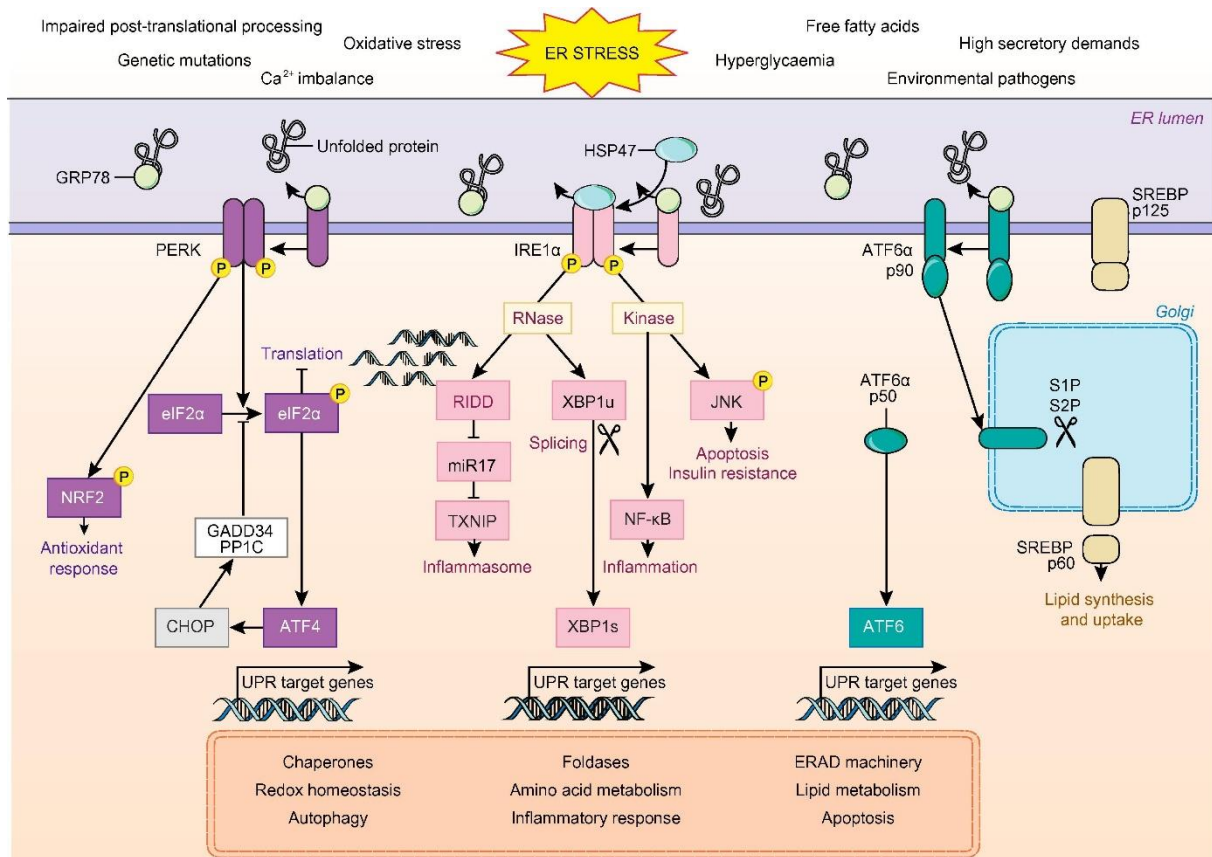


Figure 17. Cascade de signalisation de l'UPR

Le stress du RE peut être induit par plusieurs facteurs exogènes ou endogènes qui conduisent à l'accumulation de protéines non-conformes. La GRP78 se dissocie des trois récepteurs transmembranaires PERK, IRE1 et ATF6, qui activent leurs cascades de signalisation respectives afin de rétablir l'homéostasie. PERK s'homodimérise et phosphoryle eIF2α, qui va inhiber la traduction pour réduire la quantité de protéines dans le RE. Parallèlement, eIF2α induit l'expression du facteur de transcription ATF4. Par un mécanisme de rétrocontrôle négatif, ATF4 induit CHOP qui induit GADD34, une sous-unité régulatrice de PP1C, inhibant ainsi la phosphorylation d'eIF2α et restaurant la traduction. PERK peut également phosphoryler NRF2 afin de réguler l'équilibre de l'oxydo-réduction. L'IRE1α homodimérisé possède des activités endoribonucléase et kinase. IRE1α dégrade les ARNm et des microARN, tels que le miR17 qui conduit à l'expression de TXNIP et à l'activation de l'inflammasome NLRP3. IRE1α est également responsable de l'épissage de XBP1, générant le facteur de transcription XBP1s. L'activation d'IRE1α peut également conduire au recrutement de kinases impliquées dans l'inflammation médiée par NFκB ou dans l'apoptose et la résistance à l'insuline médiées par JNK. ATF6 (p90) est quant à lui transporté du RE au Golgi pour être clivé par les protéases S1P et S2P pour former le facteur de transcription cytosolique ATF6 (p50). D'après Lebeauin *et al.*, 2018.

5. Insulinorésistance et inflammation

Plusieurs modèles d'obésité ont révélé qu'une inflammation chronique des hépatocytes participe à l'émergence de l'insulinorésistance (*Lackey and Olefsky, 2016*). Les mécanismes responsables de cette régulation impliquent la phosphorylation de l'IR ou d'IRS par des médiateurs de la réponse inflammatoire (*Guo, 2014*). Comme abordé dans le paragraphe concernant l'insulinorésistance du tissu adipeux, l'activité de JNK1 est également plus importante dans les foies de souris ob/ob ou soumises à un régime, et l'inactivation de son expression améliore la sensibilité à l'insuline (*Hirosumi et al., 2002*). Cependant, l'absence d'IKK β dans le foie provoque une insulinosensibilité locale, mais une insulinorésistance du tissu adipeux et du muscle en réponse à un régime gras (*Arkan et al., 2005*). Toutefois, le système immunitaire, et plus particulièrement l'inflammation chronique, participe dans la progression de la stéatose vers la NASH, qui sera analysée dans le paragraphe dédié.

C) Réponse du foie : les hépatokines

La résistance à l'insuline est un processus multi-organe nécessitant un dialogue complexe, et dont la temporalité et les voies moléculaires impliquées sont difficiles à établir. Il a été déterminé que l'insulinorésistance hépatique précède l'insulinorésistance musculaire et du tissu adipeux dans des modèles alimentaires ou génétiques d'obésité (*Davis et al., 2010; Kraegen et al., 1991*). Les hépatocytes sécrètent environ 25% des protéines qu'ils produisent dans le plasma (*Lai et al., 2008*), cependant leur capacité à synthétiser et à sécréter des protéines est altérée lors de l'installation de la stéatose, comme il a été démontré chez la souris (*Kirpich et al., 2011*) et chez les patients (*Younossi et al., 2005*). En effet, l'étude de la capacité de traduction en condition de stéatose a révélé une perte de l'activité traductionnelle des hépatocytes dans ces conditions, suggérant une sécrétion protéique également altérée (*Fu et al., 2012*). Par ailleurs, dans un modèle de stéatose induite par un régime HFD, 20% des protéines sécrétées sont modifiées (*Meex et al., 2015*), et dans une cohorte de patients avec ou sans diabète de type 2, 69 protéines sécrétées étaient induites pour les patients diabétiques, suggérant un rôle dans l'insulinorésistance (*Kaur et al., 2012*). Ces molécules appelées hépatokines sont sécrétées en réponse aux perturbations métaboliques provoquées par la stéatose, et peuvent avoir des effets positifs ou négatifs sur le métabolisme et notamment la réponse à l'insuline (*Meex and Watt, 2017*). De nouvelles hépatokines sont régulièrement identifiées, cependant, par souci de précision, seules quelques-unes d'entre elles seront détaillées dans les paragraphes suivants. Par ailleurs, les

fonctions de *leucocyte cell-derived chemotaxin 2* (LECT2), qui a été récemment proposée comme hépatokine, et qui fait l'objet de ces travaux de thèse, seront détaillées dans le **Chapitre III**.

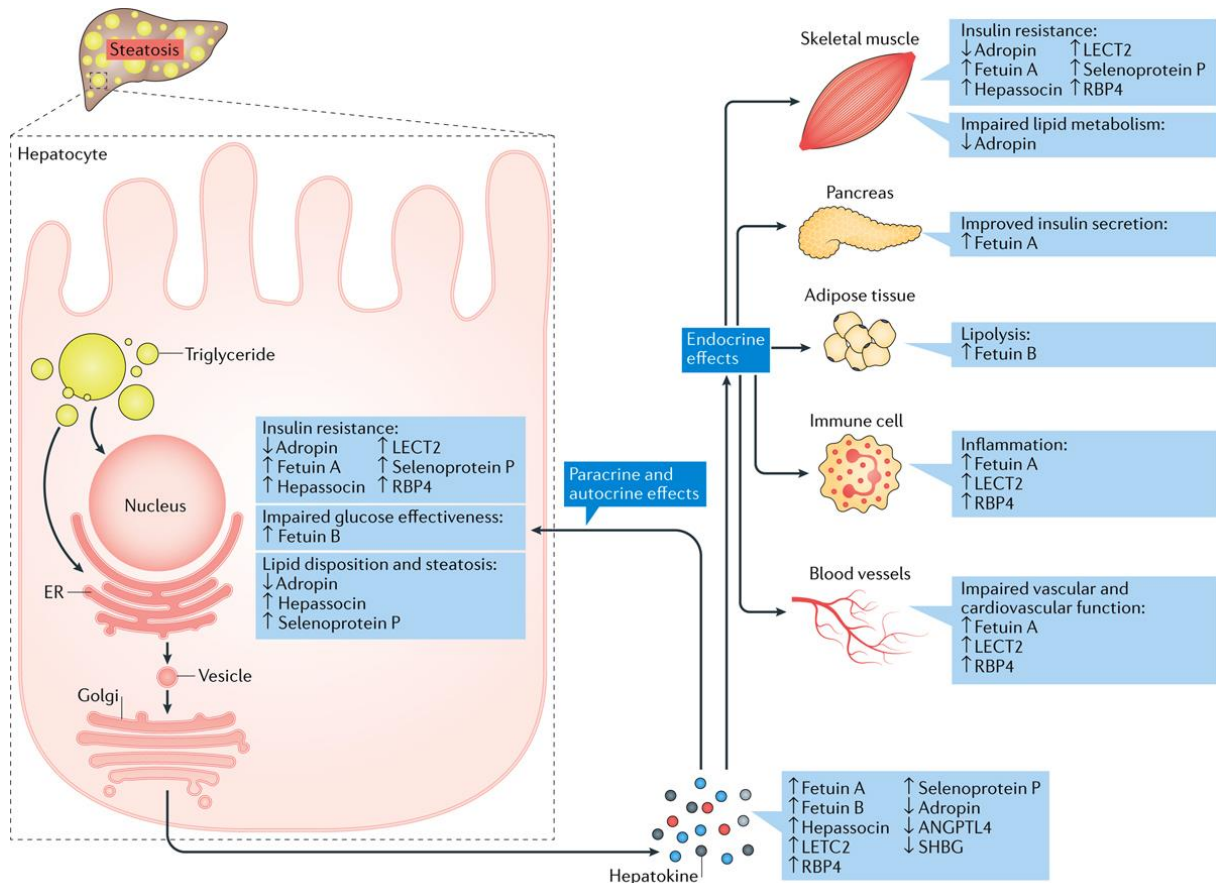


Figure 18. Les hépatokines permettent la régulation des organes métaboliques

Le profil de sécrétion des hépatocytes subit des changements suite au développement de la stéatose. L'augmentation des niveaux intrahépatiques de triglycérides induit des changements au niveau de l'expression des hépatokines et dans le fonctionnement du réticulum endoplasmique (RE), ce qui entraîne une augmentation (↑) ou une diminution (↓) de la sécrétion de certaines hépatokines. Celles-ci sont sécrétées et agissent de manière autocrine et paracrine au niveau des tissus cibles, dont le muscle squelettique, le tissu adipeux, les vaisseaux sanguins et le pancréas. Leurs effets métaboliques conduisent au développement d'une résistance à l'insuline, d'une intolérance au glucose, d'une accumulation ectopique de lipides, d'une inflammation et d'une altération de la sécrétion d'insuline. ANGPTL4, angiopoietin-like protein 4 ; LECT2, leucocyte cell-derived chemotaxin 2 ; RBP4, retinol-binding protein 4 ; SHBG, sex hormone-binding globulin. D'après Meex and Watt, 2017.

1. Fibroblast growth factor 21

Identifié initialement comme un *fibroblast growth factor* hépatospécifique (Nishimura *et al.*, 2000), FGF21 s'est avéré être un régulateur important du métabolisme énergétique. Ses effets ont été montrés pour la première fois dans la régulation de la glycémie, puisque des souris ob/ob et db/db traitées avec du FGF21 ont vu leur glycémie diminuer (Kharitonov *et al.*,

2005). De plus, son expression est induite par un apport en glucose élevé, et dépend de ChREBP et PPAR α (Iroz et al., 2017). FGF21 est également impliqué dans la régulation du métabolisme au cours du jeûne. Il est induit dans un modèle murin de jeûne ou placé sous un régime cétogénique enrichi en acides gras mais déficient en carbohydrates. De plus, son inhibition provoque une diminution de l'oxydation des acides gras et de la céto-genèse, et induit le développement d'une stéatose accompagnée d'un taux sérique de triglycérides élevé (Badman et al., 2007). Par ailleurs, son expression dans ce contexte est régulée par PPAR α (Inagaki et al., 2007). Enfin, FGF21 est produit en réponse à un déficit protéique, et induit une prise alimentaire élevée, une perte de poids, une dépense énergétique élevée et une diminution de la transcription protéique passant par la phosphorylation de eIF2 α (Laeger et al., 2014). De manière intéressante, les apports en acides gras n'affectent pas l'expression de FGF21, et l'induction de son expression est probablement due à la présence de carbohydrates dans la plupart des régimes dits *high fat* (Solon-Biet et al., 2016). Son induction a également été validée chez l'Homme pendant le jeûne prolongé (Gälman et al., 2008), le déficit protéique (Laeger et al., 2014) et la surconsommation de glucose (Lundsgaard et al., 2017), sauf dans le cadre d'un régime cétogénique (Gälman et al., 2008; Laeger et al., 2014). L'administration de FGF21 à des souris sous régime *high fat* réduit l'adiposité en augmentant la dépense énergétique, rétablit une insuliniémie normale et réduit la glycémie, et permet une régression de la stéatose associée à des niveaux sériques de triglycérides diminués. (Xu et al., 2009).

Ainsi, son induction chez les patients NAFLD (Dushay et al., 2010) suggère un mécanisme de régulation tentant d'atténuer le stress métabolique provoqué par l'apport élevé en acides gras et carbohydrates (Meex and Watt, 2017). Par ailleurs, son potentiel thérapeutique est à l'étude pour l'amélioration des désordres métaboliques (Geng et al., 2020).

2. Fétuine A

La fétuine A, également connue sous le nom de α 2-Heremans-Schmid glycoprotein (AHSG), est exprimée en réponse à un taux élevé d'acides gras libres, notamment les NEFA, sous le contrôle de *nuclear factor κ B* (NF κ B) (Dasgupta et al., 2010) et de glucose via ERK1/2 (Takata et al., 2009). C'est un facteur de risque pour le développement du diabète de type 2 (Stefan et al., 2008) et son taux sérique est corrélé avec une insulino-résistance plus élevée et la présence de stéatose chez des patients (Stefan et al., 2006). En effet, la fétuine A favorise l'insulino-résistance en bloquant l'activité tyrosine kinase de l'IR (Auberger et al., 1989;

Srinivas et al., 1993). De plus, les souris *Ahsg*^{-/-} présentent une insulinosensibilité accrue dans le foie et le muscle, et ne prennent pas de poids lorsqu'elles sont soumises à un régime riche en gras (*Mathews et al., 2002*). Par ailleurs, elle aurait un effet négatif sur la sécrétion de l'insuline directement au niveau des cellules β pancréatiques via JNK (*Gerst et al., 2017*). Il a été également démontré que les niveaux transcriptionnels de *Ahsg* étaient positivement corrélés avec ceux de *Srebp1*, *Cpt1*, *Pck1* (PEPCK) et *G6pc* (G6Pase) dans des biopsies de foie provenant de patients NAFLD (*Haukeland et al., 2012*). Un autre rôle de la fétuine A est d'induire l'insulinorésistance lipides-dépendante du tissu adipeux en activant localement la signalisation du TLR4, entretenant ainsi l'inflammation (*Pal et al., 2012*). De plus, des taux sériques élevés de NEFA et de fétuine A sont associés à un risque accru de diabète de type 2 dans une cohorte de patients sains mais présentant des prédispositions (*Stefan and Häring, 2013*). Une piste thérapeutique pourrait cibler ce dernier aspect de l'activité de la fétuine A afin d'améliorer la réponse à l'insuline (*Meex and Watt, 2017*).

III. Installation et progression de la NASH

Malgré une capacité impressionnante du foie à s'adapter à l'apport excessif d'acides gras, la persistance de ce dernier provoque des conséquences à long terme qui se traduisent par une aggravation des dommages tissulaires et la perte progressive de la fonction hépatique. Plusieurs facteurs sont en cause : la lipotoxicité, l'altération des fonctions mitochondriales, le stress du RE, la chronicité de l'inflammation, qui à long terme favorisent le développement de la fibrose, voire du carcinome hépatocellulaire (*Loomba et al., 2021a*).

A) Lipotoxicité

Comme abordé précédemment, certains lipides ont des capacités intrinsèques de signalisation, comme les DAG pour l'insulinorésistance ou les NEFA pour l'inflammation. On parle de lipotoxicité lorsque l'exposition prolongée des hépatocytes à certaines espèces lipidiques provoque une perte de fonction ou d'intégrité cellulaire, par une action directe au niveau de l'hépatocyte, ou indirectement en déclenchant l'activité des cellules immunitaires ou des fibroblastes. Cela se traduit par une modification de différents acteurs assurant la fonction de l'hépatocyte, comme la mitochondrie ou le RE, mais également par la perturbation de la signalisation cellulaire (*Marra and Svegliati-Baroni, 2018*).

1. Espèces lipotoxiques

La majorité des acides gras sont stockés sous forme de TAG inertes, cependant des acides gras libres, et notamment les SFA, peuvent s'accumuler suite à l'absorption alimentaire ou à la lipogenèse *de novo*, et avoir un effet lipotoxique dans les hépatocytes. En effet, le palmitate (C16:0) et le stéarate (C18:0) ont été impliqués dans des mécanismes pro-inflammatoires et pro-apoptotiques (*Malhi et al., 2007, 2006*). Leur conversion respectivement en acide palmitoléique (C16:1) et en oléate (C18:1) par SCD1 est essentielle dans la protection contre la lipotoxicité. En effet, le traitement d'hépatocytes avec du palmitate induit l'apoptose, tandis que l'incubation avec de l'oléate favorise la synthèse de TAG (*Ricchi et al., 2009*). De plus, l'inactivation de *Scd1* dans un modèle murin placé sous régime MCD réduit le développement de la stéatose mais favorise l'apparition de dommages tissulaires, l'apoptose d'hépatocytes et le développement de fibrose (*Li et al., 2009*). La supplémentation en oléate d'un régime MCD limite l'inflammation et la fibrose, renforçant l'aspect protecteur de cet acide gras monoinsaturé (*Lee et al., 2011*). L'effet pro-inflammatoire des SFA passe entre autres par l'activation du complexe *nucleotide oligomerization domain-containing protein (NOD)*, *LRR- and pyrin domain-containing protein 3 (NLRP3)*, par un mécanisme qui sera détaillé au paragraphe correspondant.

Le cholestérol non-estérifié est lui aussi responsable de la lipotoxicité (*Ioannou, 2016*). On retrouve des taux élevés de cholestérol libre à la fois dans les foies de patients NAFL et NASH (*Puri et al., 2007*). Il a été observé une formation de cristaux de cholestérol au niveau des membranes des gouttelettes lipidiques contenues dans les hépatocytes à la fois chez les patients NASH et dans des modèles murins (*Ioannou et al., 2013*). Ces cristaux déclenchent l'activation de NLRP3 dans les hépatocytes, ce qui facilite le recrutement de macrophages (*Ioannou, 2016*). Outre ces cristaux, l'accumulation de cholestérol libre s'accompagne de l'induction transcriptionnelle de SREBP2 et de la *steroidogenic acute regulatory protein (StAR)* dans la NASH chez l'Homme (*Caballero et al., 2009*). Cette protéine régule le transport du cholestérol de la membrane externe à la membrane interne des mitochondries (*Manna et al., 2009*). Or, il a été montré chez la souris qu'une accumulation de cholestérol libre au niveau des mitochondries est associée à une déplétion en GSH, et donc à du stress oxydant (*Mari et al., 2006*). Enfin, dans un modèle de régime *high fat high cholesterol (HFHC)*, l'accumulation de cholestérol non-estérifié est corrélée avec la sévérité de la NASH (*Savard et al., 2013*). Sous ce même régime, l'administration de molécules hypocholestérolémiantes fait régresser la formation de cristaux et la réponse inflammatoire,

améliorant ainsi la NASH (*Ioannou et al., 2015*). Ces résultats renforcent l'implication du cholestérol dans l'initiation et le maintien de l'inflammation durant la NASH.

2. Lipotoxicité et stress du réticulum endoplasmique

Outre sa participation à la résistance à l'insuline, le stress du RE est également une cause de la transition de la stéatose à la NASH (*Lebeauupin et al., 2018*). Dans un contexte d'excès de lipides, la modification dans le contenu phospholipidique de la membrane du RE provoque du stress. L'accumulation de phosphatidylcholine induit l'inhibition de la *sarco/endoplasmic reticulum calcium ATPase* (SERCA), ce qui conduit à une diminution de la concentration de calcium dans la lumière du RE (*Fu et al., 2011*). De plus, le contact direct entre les mitochondries et le RE, qui est un processus physiologique d'échange entre les deux organelles, est plus fréquent dans un contexte de NAFLD, et la surcharge en calcium cause une diminution de la capacité mitochondriale et une accumulation de ROS (*Arruda et al., 2014; Egnatchik et al., 2014*). D'autre part, le palmitate a été décrit comme un activateur du stress du RE. Le traitement de lignées humaines d'hépatocytes avec du palmitate favorise l'apoptose via l'activation de PERK (*Cao et al., 2012*). L'ajout d'oléate et de linoléate (C18:2) dans ces conditions réduit l'apoptose (*Wei et al., 2006*). La présence de palmitate provoque un changement de morphologie au niveau du RE, comme il a pu être observé par microscopie électronique (*Leamy et al., 2014*). Le rôle protecteur des MUFA et PUFA a été également mis en évidence par leurs effets positifs sur l'amélioration du stress du RE. L'invalidation de *Scd1* dans des cellules HeLa perturbe le contenu en phospholipides du RE, et induit l'apoptose médiée par PERK (*Ariyama et al., 2010*). De même, les souris *Scd1^{-/-}* présentent une signature transcriptionnelle de l'UPR lorsqu'elles sont placées sous un régime très pauvre en gras (*Flowers et al., 2008*). Enfin, le stress du RE déclenche l'activation de SREBP1c et SREBP2. En effet, dans un contexte de NASH, le stress du RE active la caspase 2, qui va cliver S1P et générer une forme soluble active. Celle-ci peut alors cliver les facteurs de transcription indépendamment de la présence de SCAP, et ainsi contribuer à l'activation constitutive de la lipogenèse et de la synthèse du cholestérol entretenant la lipotoxicité (*Kim et al., 2018*).

3. Stress oxydatif et altération de la fonction mitochondriale

Les altérations de la mitochondrie et l'augmentation du stress oxydatif sont des caractéristiques bien identifiées de la NASH (*Fromenty and Roden, 2023*). Les mitochondries

s'adaptent au surplus d'acides gras, cependant ces derniers vont causer des altérations de la chaîne de transport d'électrons entraînant un défaut d'oxydation. En effet, chez les patients NASH, l'activité des différents complexes et de l'ATP synthase est globalement diminuée (Pérez-Carreras *et al.*, 2003). Cela s'accompagne par l'induction de l'*uncoupling protein 2* (UCP2), une enzyme mitochondriale qui permet la régulation du flux de protons (Serviddio *et al.*, 2008). L'augmentation de son expression favorise la fuite de protons, ce qui décroît la synthèse d'ATP (Serviddio *et al.*, 2008). La baisse de la capacité oxydante et la fuite de protons favorisent production de ROS comme l' H_2O_2 , et les dommages à l'ADN (Koliaki *et al.*, 2015). Par ailleurs, l'activité de CPT1 est moindre dans un modèle de NASH induite par du MCD (Serviddio *et al.*, 2011). Par ailleurs, le stress oxydant et l'accumulation de cholestérol favorisent la synthèse d'oxystérols dans la NASH, comme il a été montré chez l'Homme et la souris (Raselli *et al.*, 2019). Cela suggère qu'une activation de LXR pourrait être un mécanisme protecteur contre la lipotoxicité (Becares *et al.*, 2019).

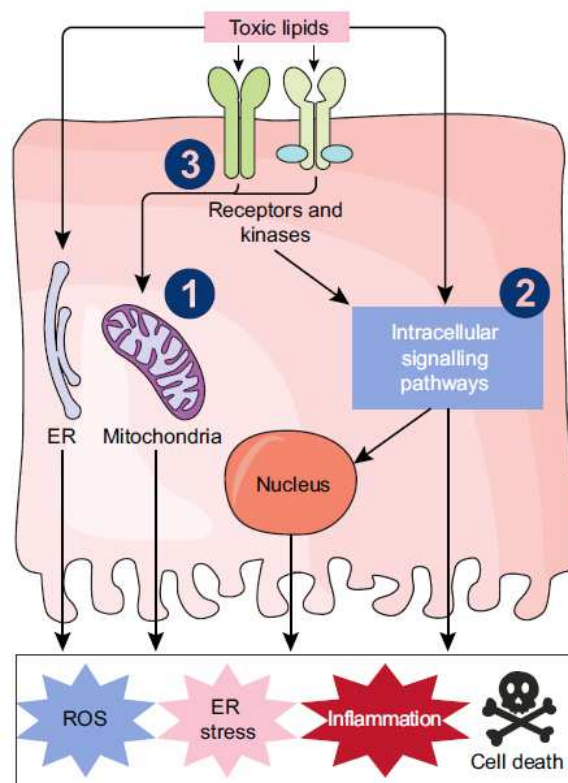


Figure 19. Les mécanismes de la lipotoxicité

La lipotoxicité peut se manifester par (1) la perturbation de la constitution et de la fonction des organelles telles que le RE et les mitochondries, (2) l'altération des voies de signalisation intracellulaires régulant le métabolisme et l'inflammation, et (3) l'interaction entre les lipides et les kinases cellulaires ou les récepteurs. D'après Marra and Svegliati-Baroni, 2018.

B) Inflammation

En conditions physiologiques, l'afflux d'antigènes alimentaires et bactériens qui proviennent en continu via la circulation porte font que le foie est un organe particulièrement tolérogène (Heymann and Tacke, 2016). Les cellules immunitaires ainsi que les cellules du parenchyme hépatique (hépatocytes, LSEC et HSC) participent au maintien de cette tolérance à l'aide de cytokines, de récepteurs intracellulaires ou encore d'interactions cellulaires (Jenne and Kubes, 2013). Cependant, dans le cadre de la NASH, le système immunitaire est chroniquement sollicité pour faire face à la lipotoxicité et au stress oxydatif et du RE. Dans un premier temps, cette inflammation permet d'éliminer les hépatocytes apoptotiques ou endommagés et favoriser la régénération hépatique dans le but de maintenir la structure et les fonctions du parenchyme hépatique. Cependant, sa chronicité va elle-même participer aux dommages du parenchyme hépatique, favorisant le développement de fibrose (Heymann and Tacke, 2016).

1. Récepteurs de l'immunité innée

a. TLRs

Les *Toll-like receptors* (TLR) sont une famille de récepteurs de l'immunité innée présents à la surface de la plupart des cellules hépatiques. Ils permettent de reconnaître les signaux endogènes libérés par les cellules en souffrance, appelés *danger-associated molecular pattern* (DAMP) ou de nature infectieuse tels les produits bactériens, appelés *pathogen-associated molecular pattern* (PAMP) (Zindel and Kubes, 2020). Plusieurs TLR ont été impliqués dans la NASH, à savoir TLR2, 4 et 9, reconnaissant respectivement les peptidoglycans des parois bactériennes, le lipopolysaccharide et l'ADN bactérien (Schuster et al., 2018). Leur activation conduit à la production de cytokines pro-inflammatoires comme le TNF α ou l'interleukine 1 β (IL-1 β) (Zindel and Kubes, 2020). Le TNF α active la signalisation de NF κ B, qui à son tour amplifie la réponse inflammatoire en permettant l'expression d'IL-1 β , d'IL-6 et de TNF α , et des molécules d'adhésion *inter-cellular adhesion molecule 1* (ICAM1) et *vascular cell adhesion molecule 1* (VCAM1) facilitant le recrutement de cellules immunitaires (Hayden and Ghosh, 2011).

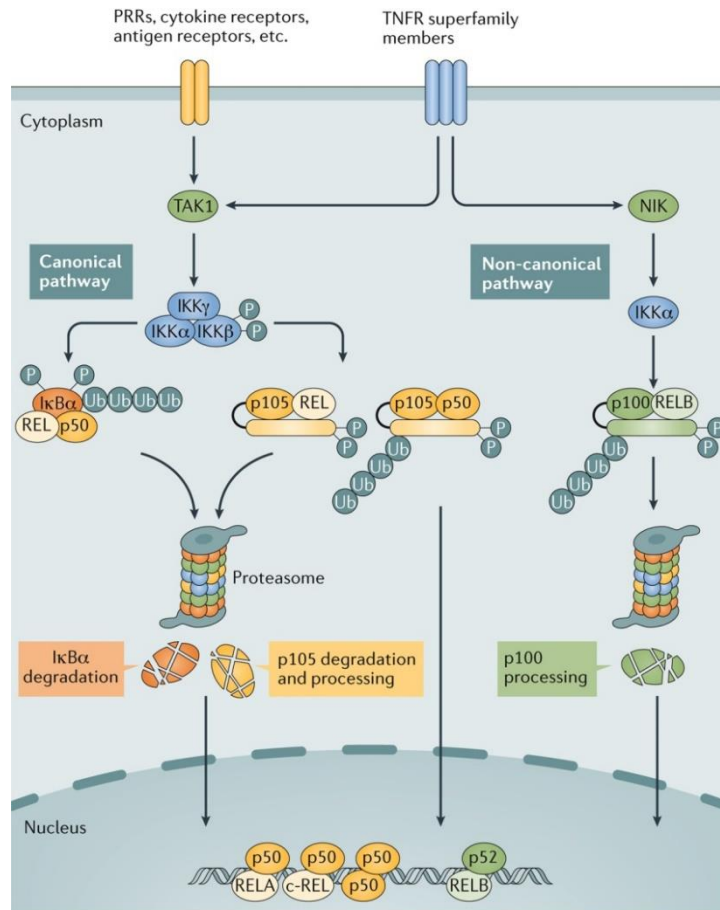


Figure 20. Activation de NFκB par les voies canonique et non-canonique

La voie canonique de NFκB est activée par des signaux provenant de plusieurs récepteurs immunitaires, qui activent la TGFβ-activated kinase 1 (TAK1). TAK1 active ensuite un complexe trimérique IκB kinase (IKK), composé de sous-unités catalytiques (IKKα et IKKβ) et régulatrices (IKKγ), via la phosphorylation d'IKKβ. Le complexe IKK, en grande partie par l'intermédiaire d'IKKβ, phosphoryle les membres de la famille des inhibiteurs de κB (IκB), tels que IκBα et p105, qui séquestrent NFκB dans le cytoplasme. Après phosphorylation par IKK, IκBα et p105 sont ciblés pour une dégradation dépendante de l'ubiquitine (Ub) dans le protéasome, ce qui entraîne la translocation nucléaire de NFκB, qui se lie aux κB enhancers des gènes cibles, sous la forme de divers complexes dimériques : RELA-p50, c-REL-p50, et p50-p50. La voie NFκB non-canonique répond sélectivement à un sous-ensemble de membres de la superfamille du récepteur du TNF (TNFR) qui ciblent l'activation de la NFκB-inducing kinase (NIK). NIK phosphoryle et active IKKα qui, à son tour, phosphoryle p100, déclenchant la dégradation sélective de p100 et conduisant à la génération de p52 et à sa translocation nucléaire avec RELB4. PRR, pattern recognition receptor. D'après Sun, 2017.

b. NLRP3

Les NLR sont des récepteurs intracellulaires reconnaissant les DAMP et PAMP. Parmi eux, NLRP3 est le plus sensible aux modifications du métabolisme et a largement été étudié dans l'induction de l'inflammation et la progression de la NASH (Schuster *et al.*, 2018). Dans ce contexte, il peut être activé par l'ATP extracellulaire provenant des cellules apoptotiques, les ions calcium relargués par le RE, les ROS, l'ADN mitochondrial ou encore les acides gras libres et le cholestérol. Cela conduit à l'activation de la caspase 1, qui va cliver pro-IL-1β et

pro-IL-18 en leurs formes matures (Jo et al., 2016). Chez les patients NASH mais pas les patients stéatosiques, NLRP3 et ses composants sont induits dans les hépatocytes, ce qui en fait une composante très importante pour la transition NAFL/NASH. L'inactivation de *Nlrp3* chez la souris protège le foie contre l'inflammation et la fibrose induites par un régime *choline deficient/amino acid defined* (CDAA) (Wree et al., 2014b). De plus, l'activation de l'inflammasome NLRP3 provoque une mort cellulaire particulièrement inflammatoire, la pyroptose, qui contribue également à l'amplification de l'inflammation dans le microenvironnement hépatique et au développement de fibrose (Wree et al., 2014a). Les *hepatic stellate cells* (HSC) et les cellules de Kupffer sont aussi sensibles à l'activation de l'inflammasome. Ce sont respectivement les fibroblastes et les macrophages résidents du foie. La différenciation de HSC en fibroblastes est induite par l'activation de NLRP3 (Watanabe et al., 2009), et l'absence de *Nlrp3* dans des cellules de Kupffer empêche la sécrétion d' IL-1 β et IL-18 après traitement par du palmitate, suggérant l'implication de ces cellules dans la réponse inflammatoire due à la lipotoxicité (Cai et al., 2017). Enfin, l'activation de NLRP3 dans les macrophages semble être dépendante du cholestérol (De La Roche et al., 2018; C. Guo et al., 2018).

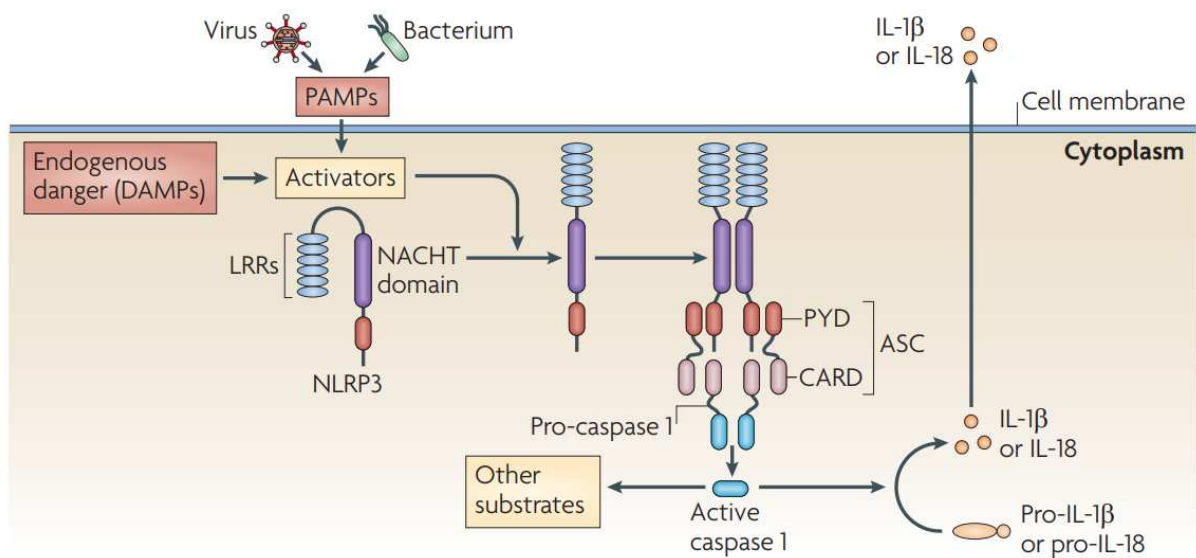


Figure 21. Activation de l'inflammasome NLRP3

Dans des conditions physiologiques, NLRP3 est auto-réprimé par l'interaction entre les domaine NACHT et LRR. Cette auto-répression est levée en présence de PAMP provenant de micro-organismes ou de DAMP provenant de signaux de danger endogènes. Ainsi, le domaine NACHT est exposé, et NLRP3 s'oligomérisse et recrute la protéine apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD (ASC) et la pro-caspase 1. Celle-ci est clivée en caspase 1, qui à son tour permet la maturation des cytokines pro-inflammatoires IL-1 β et IL-18. CARD, caspase-recruitment domain ; LRRs, leucine-rich repeats ; NACHT, NAIP, CIITA, HET-E et TP1 ; PYD, pyrin domain. D'après Tschopp and Schroder, 2010.

2. Effecteurs cellulaires

a. Cellules de Kupffer

De nombreux types de cellules immunitaires sont présents dans le foie et participent de manière complémentaire au maintien de la tolérance ou à la réponse inflammatoire. Parmi les cellules myéloïdes, la population la plus abondante est celle des cellules de Kupffer (KC), les macrophages résidents du foie ([Peiseler et al., 2022](#)). Les KC n'ont pas une origine hématopoïétique comme leurs homologues circulants, mais proviennent du sac vitellin embryonnaire ([Gomez Perdiguero et al., 2015](#)). Elles sont localisées dans les sinusoides hépatiques dans la zone péri-portale et sondent l'environnement à l'aide de prolongements cytoplasmiques, passant entre les cellules endothéliales pour inspecter l'espace de Dissé ([Bonnardel et al., 2019](#)). En physiologie, elles participent à de nombreux processus tels que l'homéostasie du fer et du cholestérol ([Guilliams and Scott, 2022](#)). En effet, les KC expriment entre autres *T-cell immunoglobulin and mucin domain containing 4* (TIM4), permettant de capter les globules rouges, le *scavenger receptor* CD163 reconnaissant l'hémoglobine libre, ainsi que l'hème oxygénase (HO1), permettant la dégradation de l'hème et la ferroportine 1 ([Guilliams et al., 2022](#)). De plus, TIM4 et CD36 captent les LDL oxydées et le cholestérol issu des fragments membranaires des cellules apoptotiques. Une fois recyclé, le cholestérol est exporté via ABCA1 et ABCG1 dans les HDL ([Guilliams and Scott, 2022](#)). Outre la régulation endogène des processus métaboliques et inflammatoires par LXR ou *inhibitor of differentiation 3* (ID3) ([Mass et al., 2016](#); [Sakai et al., 2019](#); [Scott et al., 2018](#)), des signaux provenant des autres cellules hépatiques régulent et maintiennent les fonctions des KC : les LSEC expriment *delta-like canonical NOTCH ligand 4* (DLL4), induisant la voie NOTCH, les HSC expriment *bone morphogenetic protein 9* (BMP9) et 10 qui interagissent avec *activin receptor-like kinase 1* (ALK1), et les hépatocytes sécrètent du desmostérol qui interagit avec LXR ([Bonnardel et al., 2019](#); [Mass et al., 2016](#); [Sakai et al., 2019](#); [D. Zhao et al., 2022](#)).

Parmi les nombreuses études récentes qui ont analysé le rôle des KC dans la NASH, il a été démontré que ces cellules sont rapidement déplétées, et qu'un mécanisme compensatoire induit le recrutement de macrophages et leur conversion en *monocyte-derived KC* (moKC) ([Daemen et al., 2021](#); [Remmerie et al., 2020](#); [Seidman et al., 2020](#); [Tran et al., 2020](#)). Dans d'autres conditions, les KC peuvent proliférer afin de reconstituer leur niche ([Scott et al., 2016](#)), mais ce n'est pas le cas dans la NASH, où ce sont les moKC qui prolifèrent ([Remmerie et al., 2020](#); [Tran et al., 2020](#)). Toutefois, les KC ont une capacité de prolifération

fonctionnelle, puisque la stimulation par du *colony-stimulation factor 1* (CSF1) induit leur prolifération (Remmerie et al., 2020), suggérant un déséquilibre dans le contenu en facteurs de prolifération sécrétés par d'autres types cellulaires dans ce contexte pathologique (Guilliams et al., 2020). Mais avant d'être déplétées, les KC sont activées et sécrètent des cytokines pro-inflammatoires comme le TNF α et l'IL-1 β et ces chimiokines telles que *C-C motif chemokine ligand 2* (CCL2) et CCL5 fin de recruter d'autres cellules immunitaires (Krenkel and Tacke, 2017). Ce serait donc leur capacité à recruter d'autres cellules plutôt qu'une activité intrinsèque qui participe à la mise en place de l'inflammation dans la NASH, puisque l'inhibition pharmacologique de CCL2 dans un modèle murin de MCD réduit l'infiltration de monocytes et l'expression de TNF α et d'IL-6, ainsi qu'une diminution de la stéatose sans affecter le développement de fibrose (Baeck et al., 2012).

Parmi les populations recrutées, on peut distinguer des macrophages présentant des similitudes avec les *lipid-associated macrophages* (LAM) du tissu adipeux. Cette population est enrichie à la fois dans les foies des patients et dans différents modèles murins de NASH (Ramachandran et al., 2019; Remmerie et al., 2020). Cependant la nature définitive ou transitoire de cette population reste à déterminer, puisqu'il est encore difficile de distinguer si les LAM hépatiques ont une fonction propre, ou si elles vont évoluer pour devenir des moKC (Guilliams and Scott, 2022). Leur fonction reste difficile à établir, puisque ces cellules expriment l'ostéopontine (Remmerie et al., 2020), un marqueur dont l'expression a été corrélée avec la progression de la NASH chez les patients (Glass et al., 2018), et dont la neutralisation prévient le développement de fibrose et réduit l'inflammation (Honda et al., 2020; Kiefer et al., 2010). Cependant, il est possible également que les LAM hépatiques jouent un rôle dans l'élimination des débris cellulaires ou de cellules apoptotiques afin de limiter les dommages tissulaires, puisqu'elles sont localisées dans les zones de fibrose et peuvent former des structures en couronne autour d'hépatocytes stéatosiques (Daemen et al., 2021).

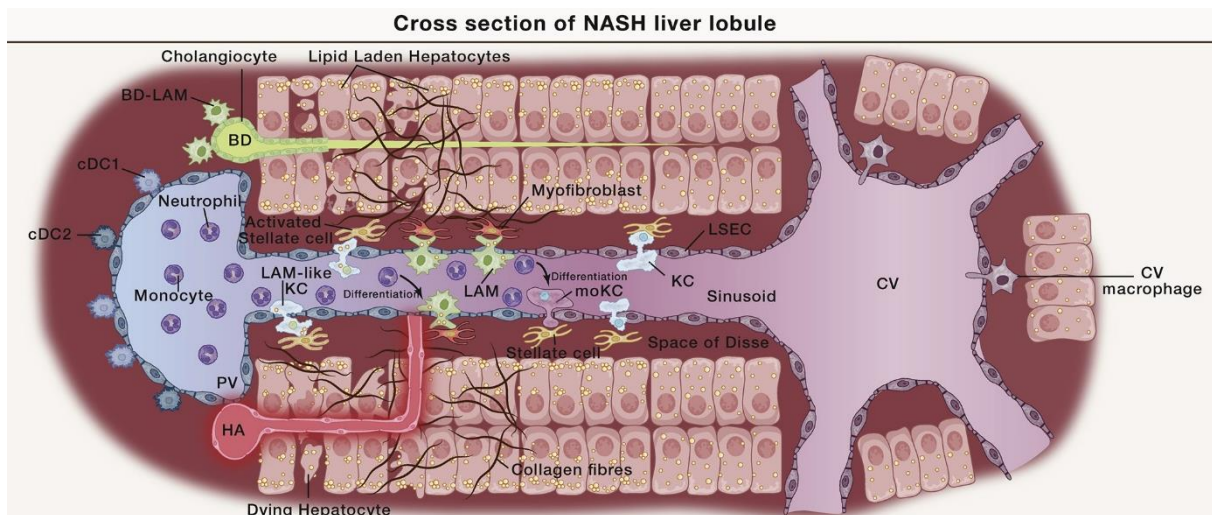


Figure 22. Effecteurs myéloïdes de l'inflammation hépatique

Durant le développement de la NASH, les KC sont déplétées et un afflux de cellules myéloïdes infiltre le foie. La niche des KC est repeuplée par des macrophages qui acquièrent des caractéristiques similaires aux KC. D'autres macrophages peuvent se différencier en LAM, dont la fonction dans le foie reste encore à élucider. Adapté de [Guilliams and Scott, 2022](#).

b. Cellules *natural killer*

Les lymphocytes sont également une population très importante du foie, avec un enrichissement particulier en cellules *natural killer* (NK), NKT et T CD8⁺ ([Jenne and Kubec, 2013](#)). Le rôle des NK dans le développement des NAFLD est encore à l'étude, avec plusieurs résultats contradictoires ([Martínez-Chantar et al., 2021](#)). Certaines études révèlent que les NK circulantes seraient déplétées chez les patients obèses, et qu'elles présenteraient des fonctions cytotoxiques amoindries malgré leur état d'activation, évalué par l'expression de CD69 ([Michelet et al., 2018](#); [Viel et al., 2017](#)) tandis que d'autres ne trouvent pas cette diminution de la population mais une augmentation de l'expression du récepteur à l'IL-6 et du récepteur activateur NKG2D ([Stiglund et al., 2019](#); [Theurich et al., 2017](#)). D'autre part, le développement de fibrose aurait une incidence sur la capacité cytotoxique des NK, puisque les cellules CD56^{dim} provenant de patients NASH avec peu de fibrose sont plus cytotoxiques que celles provenant de patients NASH très fibrotiques ([Amer et al., 2018](#)).

c. NKT

Les NKT sont fortement impliquées dans l'inflammation et la progression vers la fibrose. En effet, elles sécrètent LIGHT, une cytokine de la superfamille des TNF qui induit l'accumulation de lipides par les hépatocytes ([Wolf et al., 2014](#)). De plus, les NKT invariantes

(iNKT) permettent le recrutement d'autres types cellulaires comme les lymphocytes T CD8 ou les monocytes, ainsi que l'activation et la différenciation des HSC en fibroblastes, promouvant ainsi la fibrose dans un modèle murin de NASH induite par un régime CDAA (*Maricic et al., 2018*). L'activation des HSC passe par l'induction de la voie Hedgehog qui régule la production d'opsonine par les HSC, et par la sécrétion d'opsonine directement par les iNKT (*Syn et al., 2012*). Toutefois, l'activation des NKT est restreinte dans les NAFLD puisque l'expression de CD1d, une molécule similaire aux complexes majeurs d'histocompatibilité (CMH) permettant la présentation des antigènes lipidiques aux NKT, est diminuée chez les souris ob/ob à cause du stress du RE (*Yang et al., 2007*). De plus, les KC favorisent l'apoptose et la nécrose des NKT suractivées à travers la sécrétion d'IL-12 (*Kremer et al., 2010; Tang et al., 2013*).

d. Lymphocytes T

Les lymphocytes T CD8 agissent de concert avec les NKT en contribuant à l'inflammation et à la progression de la NASH vers le CHC par l'activation de la voie NF κ B (*Wolf et al., 2014*). Tout comme les NKT, elles participent à l'activation des HSC (*Breuer et al., 2020*). Elles sont accumulées dans la NASH chez les patients (*Haas et al., 2019*), et très récemment, il a été identifié un mécanisme d'activation des CD8 antigène-indépendant appelé auto-agression, présent à la fois chez les patients et dans les modèles murins de NASH. Une population CD8⁺ CXCR6⁺ PD1⁺ granzyme⁺ est accumulée dans le foie sous l'effet de l'IL-15 qui induit l'expression de CXCR6 par l'inhibition de FOXO1. Ces cellules vont réagir, grâce au récepteur purinergique P2RX7, à des métabolites endogènes tels que l'acétate, l'ATP ou encore le calcium, qui vont déclencher leur mécanisme de cytotoxicité. Celui-ci ne passe pas par l'utilisation du granzyme B ou de la perforine, mais par une interaction directe entre les CD8 et les hépatocytes via LFA1-ICAM, suivie de l'induction de l'apoptose via Fas/FasL (*Dudek et al., 2021*). Toutefois, les CD8 semblent également avoir un rôle positif dans la régulation de l'inflammation, puisqu'elles permettent l'élimination des HSC afin de limiter le développement de fibrose (*Koda et al., 2021*). Il est intéressant de noter que les lymphocytes T CD4 sont déplétées dans la NASH, aussi bien chez les patients que la souris, et cette perte accélère l'apparition du CHC. Cette déplétion est due à la lipotoxicité de l'acide linoléique, qui favorise la production de ROS par les CD4 (*C. Ma et al., 2016*). On retrouve également des lymphocytes CD4 polarisés vers un profil Th1, participant à l'inflammation en sécrétant de l'interféron γ (IFN γ) et du TNF α , et des Th17 qui sécrètent de

l'IL-17 qui facilite la transition de la stéatose à la NASH (*Koo et al., 2020*). Chez la souris, un régime HFD induit une déplétion en T régulatrices (Treg) due à une sensibilité accrue au stress oxydant, et le transfert adoptif de Treg améliore l'inflammation (*Ma et al., 2007*). Enfin, dans une cohorte de patients NAFL et NASH, l'augmentation du ratio Th17/Treg circulantes a été corrélée avec l'aggravation de la maladie (*Rau et al., 2016*).

Ainsi, le microenvironnement est fortement affecté par des signaux inflammatoires provenant des cellules immunitaires et des cellules du parenchyme hépatique, qui s'auto-entretiennent par l'effet cytotoxique sur les hépatocytes, conduisant ainsi à une dégradation progressive du tissu et l'apparition de plages de fibrose.

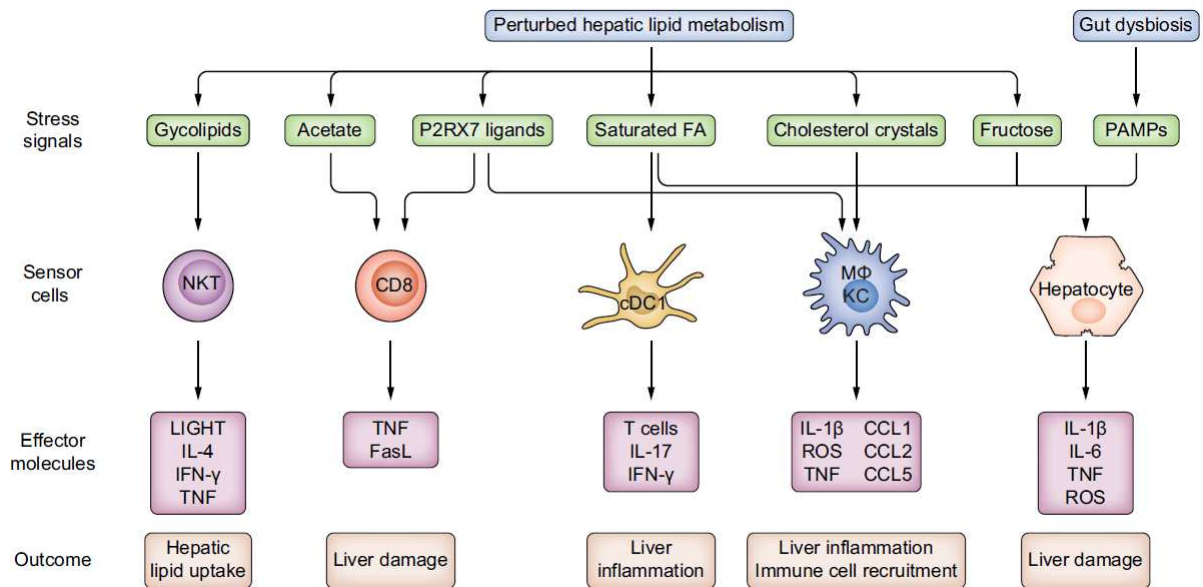


Figure 23. Perturbations métaboliques et conséquences sur l'activation du système immunitaire

De nombreuses molécules telles que les métabolites circulants, les PAMPs, mais également les perturbations métaboliques affectent les hépatocytes et stimulent les cellules immunitaires. En réponse à ces signaux, des cytokines et des chimiokines sont sécrétées par les deux catégories de cellules. L'activation métabolique des NKT induit la sécrétion de LIGHT, accentuant la stéatose et les lésions hépatiques. Les cellules T CD8 peuvent être activées par des stimuli métaboliques et, en conséquence, exprimer FasL et sécréter du TNF α . Les produits bactériens peuvent également induire une réponse interféron de type I qui est associée à une infiltration hépatique de lymphocytes T CD8 et CD4, et à une différenciation ultérieure des T CD4 en Th1 ou Th17. Les cytokines sécrétées par les lymphocytes T génèrent un milieu favorable pour la polarisation des macrophages inflammatoires, l'activation de l'inflammasome et la fibrogenèse. La libération des cytokines pro-inflammatoires IL-1 β et IL-18 par les hépatocytes souffrants, ainsi que d'autres médiateurs effecteurs, pourrait conduire à l'inflammation et aux lésions hépatiques observées. cDC1, cellule dendritique conventionnelle de type 1 ; FA, fatty acids ; M Φ , macrophage. D'après *Yahoo et al., 2023*.

3. Inflammation du tissu adipeux

Le tissu adipeux contribue à la NASH en sécrétant du TNF α , de l'IL-6 et des adipokines telles que l'adiponectine et la leptine (H. Wang et al., 2021). L'adiponectine a des effets anti-inflammatoires en inhibant la voie NF κ B et en empêchant la sécrétion de TNF α au niveau du tissu adipeux (Maeda et al., 2002). D'autre part, elle induit la production d'IL-10 et de l'antagoniste du récepteur à l'IL-1 (IL-1Ra) (Wolf et al., 2004). L'adiponectine permet de réduire la néoglucogenèse au niveau du foie, d'induire l'oxydation des acides gras au niveau du muscle, et protège de la lipotoxicité au niveau des cellules pancréatiques et cardiaques (Funcke and Scherer, 2019). La leptine est une hormone qui régule la prise alimentaire en agissant au niveau du cerveau. Au niveau du foie, l'augmentation de la concentration en leptine circulante permet de diminuer l'expression de SREBP1c (Kakuma et al., 2000). De plus, elle a des fonctions pro-inflammatoires en induisant la production de TNF α via p38 et JNK dans les KC (Shen et al., 2005). Chez les patients et dans les modèles murins de régime, on observe une sécrétion plus importante de la leptine mais une résistance à ses effets sur la satiété, associée à une diminution de l'adiponectine (Ren et al., 2022). On retrouve également dans le tissu adipeux des patients NAFLD une accumulation de macrophages et lymphocytes inflammatoires, dont la présence est inversement corrélée avec la résistance à l'insuline (Fuchs et al., 2021).

C) Axe entéro-hépatique

Le dialogue intestin-foie contrôle l'homéostasie globale du métabolisme. Les nutriments, les antigènes bactériens, les métabolites et les acides biliaires régulent le métabolisme et les réponses immunitaires dans l'intestin et le foie, qui en retour modulent le microbiote intestinal. Il a été mis en évidence qu'une alimentation de type *Western diet* provoque une dysbiose (Boursier et al., 2016) et des lésions de l'épithélium intestinal, facilitant la fuite de bactéries dans la circulation et le développement d'une endotoxémie (Erridge et al., 2007; Pendyala et al., 2012). L'inflammation générée par le LPS circulant facilite l'insulinorésistance et l'obésité (Cani et al., 2007). De plus, le transfert de microbiote d'une souris ob/ob à une souris contrôle permet de reproduire les mêmes perturbations métaboliques, démontrant ainsi que la flore intestinale elle-même est un acteur important dans la pathologie (Turnbaugh et al., 2006). Par ailleurs, l'épithélium intestinal exprime des TLR à sa surface, dont le TLR5 qui reconnaît la flagelline. L'ablation du TLR5 chez la souris provoque une hyperphagie conduisant au développement d'une stéatose et d'une

inflammation hépatique exacerbée, associées à une altération du microbiote. Le transfert de microbiote d'une souris *Tlr5*^{-/-} à une souris contrôle permet de reproduire les mêmes affections hépatiques (*Vijay-Kumar et al., 2010*). L'inflammasome est également impliqué dans la régulation du microbiote intestinal. Dans des modèles déficients en *Nlrp3* ou en *Il-18* sous un régime MCD, la NASH est aggravée en raison du surplus de ligands des TLR4 et 9 présents dans la circulation et qui déclenchent la production de TNF α au niveau du foie (*Henao-Mejia et al., 2012*).

Le microbiote intestinal intervient également dans la métabolisation des acides biliaires, en effectuant des transformations secondaires qui vont modifier leurs propriétés (*Wahlström et al., 2016*). Dans la progression de la NASH chez les patients, on observe une accumulation d'acides biliaires conjugués et une diminution en acides biliaires secondaire comparativement aux patients NAFL (*Puri et al., 2018*). Comme brièvement décrit dans le **Chapitre 1**, la synthèse des acides biliaires est régulée par LXR, qui induit les gènes impliqués dans cette voie, et par FXR (*Nr1h4*), qui réprime leur expression. Cette régulation négative se fait par liaison directe des acides gras sur FXR, qui peut ainsi se lier à *small heterodimer protein* (SHP) et inhiber la transcription de *Cyp7a1*, l'enzyme limitante de la voie de synthèse (*Fuchs and Trauner, 2022*). Dans les entérocytes, FXR induit la sécrétion de FGF19 (FGF15 chez la souris) qui réprime *Cyp7a1* dans l'hépatocyte via FGFR4 et SHP (*Inagaki et al., 2005*). L'activation de FXR dans les hépatocytes réoriente le métabolisme vers l'inhibition de la lipogenèse et l'activation de la β -oxydation par l'activation de PPAR α (*Jahn et al., 2015; Pineda Torra et al., 2003*). Toutefois, malgré un rôle positif de FXR sur le métabolisme dans l'hépatocyte, il semble que ce ne soit pas le cas lorsqu'il est activé dans les entérocytes. En effet, dans un modèle *Nr1h4*^{-/-} entéro-spécifique nourri avec du HFD, le microbiote est modifié mais l'obésité et l'insulinorésistance sont moindres (*F. Li et al., 2013*). D'un point de vue mécanistique, l'activation entérique de FXR provoque la synthèse de céramides qui sont relargués dans la circulation et favorisent la lipotoxicité au niveau du foie (*Jiang et al., 2015*). Cependant, les effets négatifs du microbiote sur le développement des NAFLD semble être FXR-dépendants, puisque le transfert de microbiote d'une souris *Nr1h4*^{-/-} nourrie avec du HFD ne provoque ni stéatose, ni obésité dans son nouvel hôte. De plus, l'analyse métagénomique de ce microbiote révèle un enrichissement en familles de bactéries ayant un rôle protecteur contre l'obésité (*Parséus et al., 2017*).

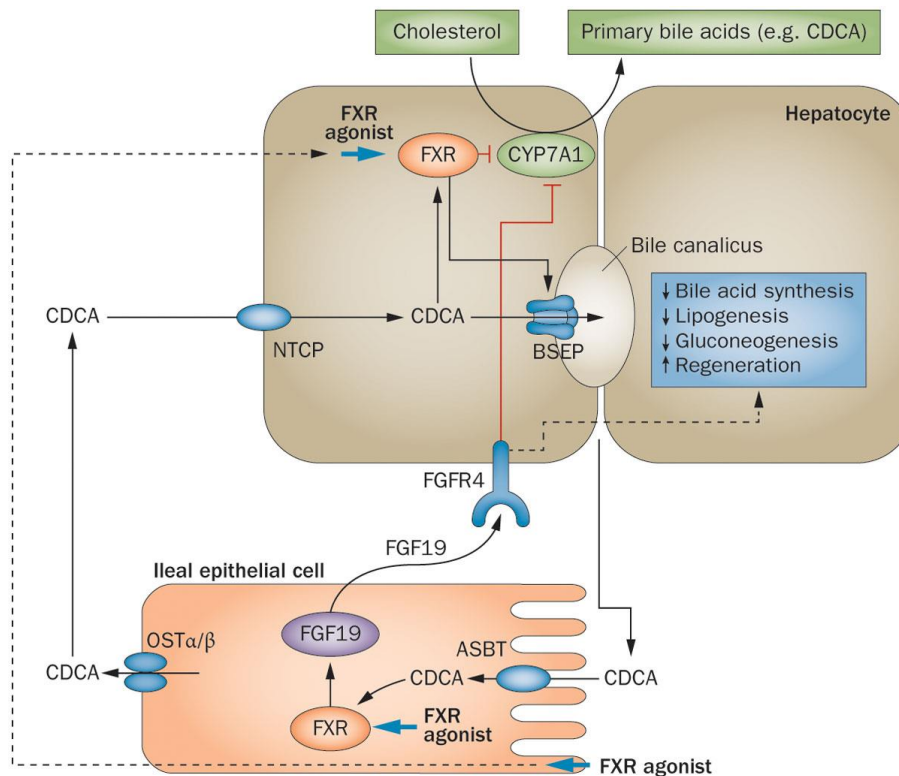


Figure 24. Régulation du métabolisme hépatique par FXR

Les acides biliaires (par exemple l'acide chenodéoxycholique, CDCA) sont produits dans le foie par CYP7A1 à partir de cholestérol. Les sels biliaires sont sécrétés dans les canalicules biliaires et acheminés jusqu'à la vésicule biliaire. Après leur relargage dans les intestins, les acides biliaires sont réabsorbés par les entérocytes et activent FXR, ce qui stimule la sécrétion de FGF15/19 dans la circulation portale. Dans le foie, FGF15/19 se lie à son récepteur FGFR4, qui active une voie de signalisation impliquant des MAP kinases et provoque la répression de CYP7A1. Dans le foie, les acides biliaires se lient à FXR, qui interagit avec SHP afin de réduire l'expression de CYP7A1. Abréviations : ASBT, apical sodium-dependent bile salt transporter ; BSEP, bile salt export pump ; NTCP, Na⁺-taurocholate cotransporting polypeptide ; OST, organic solute transporter. D'après *Schaap et al., 2014*.

L'ensemble de ces observations renforcent la nature multi-organe des NAFLD et illustrent l'importance du dialogue entéro-hépatique dans leur progression.

D) LXR et lipotoxicité hépatique

Par ses effets régulateurs sur la lipogénèse et le métabolisme du cholestérol, LXR présente des fonctions protectrices au cours des NAFLD à différents niveaux.

1. Contenu en acides gras

LXR participe à la régulation de la lipotoxicité en favorisant la synthèse de MUFA et PUFA. En effet, il a été montré que LXR peut induire l'expression de SCD1 de manière SREBP1c-indépendante (*Chu et al., 2006*). De plus, LXR module l'expression de LPCAT3, une protéine

responsable du recrutement de PUFA dans le RE. Chez les souris déficientes en LXR α/β nourries avec un régime riche en gras et en sucres, le stress du RE est induit par la modification de la composition lipidique de sa membrane due à la perte de la LPCAT3, ce qui génère de l'inflammation (*Rong et al., 2013*)

2. Homéostasie du cholestérol dans l'hépatocyte

Dans les NAFLD, l'expression de LXR est positivement corrélée avec la progression de la pathologie (*Ahn et al., 2014; Lima-Cabello et al., 2011*). L'expression de LXR semble avoir des effets protecteurs, puisque la surcharge en cholestérol chez des souris dépourvues de LXR α provoque un défaut de son catabolisme, une élévation des niveaux sériques de transaminases et l'activation des KC qui favorisent le recrutement de monocytes et l'inflammation du tissu (*Endo-Umeda et al., 2018a*). De plus, l'administration de l'agoniste T0901317 améliore l'inflammation et réduit le taux de cholestérol, malgré une stéatose plus importante (*Wouters et al., 2010*). De manière surprenante, l'antagoniste pharmacologique SR9238 améliore également l'inflammation et la fibrose tout en réduisant la stéatose dans un modèle de NASH murin (*Griffett et al., 2015*). Enfin, l'activation constitutive de LXR α par la mutation de son site de phosphorylation inhibitrice Ser196 conduit à une diminution des taux de cholestérol sériques et hépatiques, associée à une fibrose et une inflammation moindres dans le cadre d'un régime riche en cholestérol, démontrant ainsi le rôle protecteur de LXR dans les NAFLD (*Becares et al., 2019*).

3. Implication dans la réponse inflammatoire

En plus de ses fonctions métaboliques dans l'hépatocyte, LXR est également essentiel pour le bon fonctionnement des cellules immunitaires. En effet, son expression dans ces cellules favorise l'efflux de cholestérol via les transporteurs ABCA1 et ABCG1. L'invalidation de ABCA1 et ABCG1 dans les macrophages provoque une accumulation de TLR2 et 4 (*Yvan-Charvet et al., 2008*). Or, ABCA1 a été identifié comme un modulateur de la composition lipidique de la membrane, ce qui a un effet sur sa fluidité et influence le recrutement de *myeloid differentiation factor 88* (Myd88), la protéine adaptatrice qui permet la transduction du signal des TLR. Ainsi, LXR, à travers ABCA1, empêche le recrutement de Myd88 et l'induction de la voie NF κ B, ce qui limite l'inflammation et le recrutement de monocytes (*Ito et al., 2015*). Il a également été montré que la SUMOylation de LXR, c'est-à-dire l'ajout de protéines *small ubiquitin-related modifiers*, lui permet d'inhiber l'activité de NF κ B et

d'empêcher la transcription de gènes inflammatoires comme l'*Il-1 β* ou la *nitric oxide synthase* (NOS) (Ghisletti et al., 2007; Venteclef et al., 2010). Par ailleurs, LXR permet de réduire les lésions hépatiques provoquées par un régime gras associé à une stimulation par du LPS en inhibant la signalisation PI3K et JNK (Liu et al., 2012). Enfin, les PUFA synthétisés grâce à LXR permettent l'acétylation des promoteurs des gènes cibles de NF κ B, ce qui empêche leur transcription (P. Li et al., 2013).

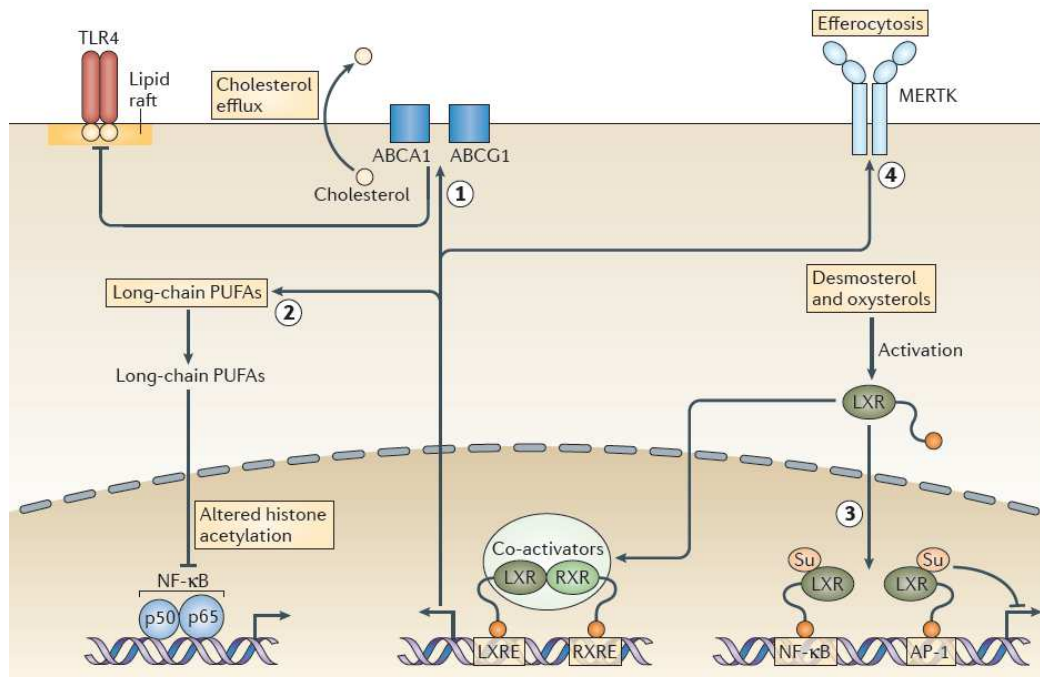


Figure 25. Mécanismes anti-inflammatoires de LXR

LXR exerce ses effets anti-inflammatoires (1) à travers ABCA1, qui inhibe la signalisation TLR et l'induction de la voie NF κ B ; (2) en promouvant la synthèse de PUFA qui acétylent les promoteurs des cibles de NF κ B (3) par sa SUMOylation, lui permettant d'inhiber la transcription de cibles de NF κ B ; (4) en favorisant l'expression de MERTK, une tyrosine kinase qui favorise l'efferocytose des cellules apoptotiques par les macrophages. D'après Tall and Yvan-Charvet, 2015.

IV. Vers l'émergence du carcinome hépatocellulaire

Le cancer du foie est la troisième cause de décès par cancer à l'échelle mondiale. Parmi les différents types de tumeurs primitives, il est le plus fréquent avec 90% des incidences (Llovet et al., 2021). Les étiologies les plus fréquentes pour le CHC sont les infections virales (hépatites B et C) ou la consommation excessive d'alcool ayant provoqué une cirrhose, mais son développement à partir de foies ayant subi des désordres métaboliques, comme les NAFLD, le diabète de type 2 ou le syndrome métabolique est de plus en plus fréquent (Llovet et al., 2021). En effet, le stress métabolique et la souffrance hépatocytaire entretiennent une

inflammation chronique qui déclenche la fibrogenèse. Celle-ci peut à terme évoluer en cirrhose, et sensibiliser à l'émergence du CHC, mais la fibrose n'est pas un prérequis pour le développement du CHC sous un fond métabolique (*Llovet et al., 2021*).

A) La fibrose hépatique

La fibrogenèse est un processus permettant le maintien de l'intégrité d'un tissu lésé en formant du tissu cicatriciel composé de protéines de la matrice extra-cellulaire, notamment du collagène de type I (*Kisseleva and Brenner, 2021*). L'acteur cellulaire majeur de ce processus est l'HSC, qui s'active et se différencie en myofibroblaste suite à la stimulation par différentes cytokines pro-inflammatoires. Les HSC sont localisées dans l'espace de Disse, entre les hépatocytes et les LSEC en conditions physiologiques, mais une fois activées, elles peuvent migrer sur le site endommagé (*Iwaisako et al., 2014*).

1. Inflammation et développement de fibrose

La mort hépatocytaire et l'inflammation sont des éléments indispensables pour le déclenchement de la fibrogenèse. Les hépatocytes souffrants relarguent différents facteurs capables d'activer les HSC, notamment du *transforming growth factor β* (TGF β), l'ostéopontine et la NADPH oxydase, et activent différentes voies pro-fibrosantes telles que NOTCH, YAP/TAZ, ou encore Hedgehog (*Lan et al., 2015; Schwabe et al., 2020; Wang et al., 2016; Xie et al., 2013; Zhu et al., 2018*). L'autre source majoritaire de TGF β sont les KC et les macrophages (*Karlmarm et al., 2009*). Le TGF β est essentiel pour la mise en place de la réponse fibrogénique. En effet, l'induction de la fibrose dans un modèle murin dépourvu de TGF β ne produit que des effets limités, tandis que la surexpression de TGF β provoque un développement de fibrose spontané (*Gauldie et al., 2007; Hellerbrand et al., 1999*). Toutefois, l'absence à long terme de TGF β provoque un défaut de réparation tissulaire et augmente le risque d'émergence tumorale (*Kulkarni and Karlsson, 1997*). Par ailleurs, le TGF β permet aux lymphocytes CD4 de se différencier en Th17, qui sécrètent l'IL-17a qui a un fort pouvoir activateur pour la fibrogenèse, et l'IL-22 qui favorise la survie des hépatocytes (*Meng et al., 2012; Zenewicz et al., 2007*). Les LSEC sécrètent des facteurs permettant de maintenir les HSC quiescentes, notamment l'oxyde nitrique. Cependant durant la phase de fibrogenèse, elles perdent leurs fonctions modulatrices car elles deviennent capillarisées (*Maretti-Mira et al., 2019; Xie et al., 2012*). Les HSC sont également capables de détecter des produits bactériens et l'ADN extracellulaire dans le microenvironnement car elles expriment TLR4 et TLR9 à leur

surface. Leur signalisation via Myd88 déclenche l'activation de NFκB et permet l'activation des HSC (*Seki et al., 2007; Watanabe et al., 2007*). Ainsi, l'étroite collaboration entre les cellules immunitaire et parenchymateuses permet de créer un microenvironnement régulateur afin de contrôler le processus de fibrogenèse. Toutefois, l'absence de résolution de l'inflammation empêche la régression de la fibrose, et continue à favoriser la formation de matrice extracellulaire, au détriment de la régénération (*Schwabe et al., 2020*).

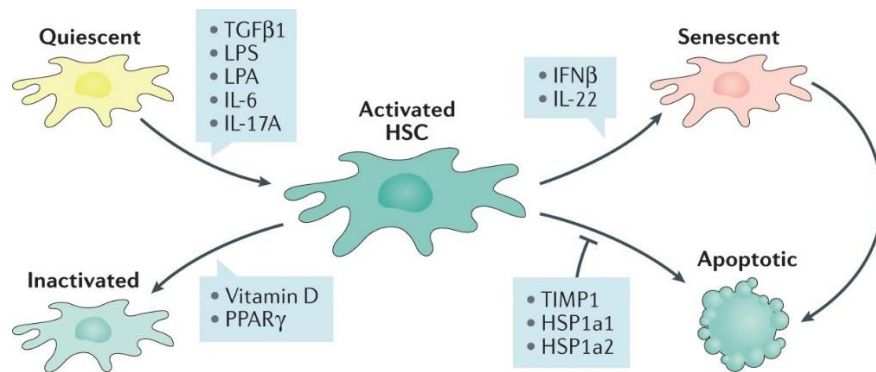


Figure 26. Mécanismes d'induction de la fibrose au cours de la NASH

L'apoptose des hépatocytes et l'inflammation produisent des signaux permettant l'activation des HSC. Celles-ci sécrètent des protéines de la matrice extracellulaire afin de maintenir l'intégrité du tissu. L'absence de signaux de résolution empêche l'apoptose des HSC et promeut un dépôt excessif de collagène dans le parenchyme hépatique. Adapté de *Kisseleva and Brenner, 2021*.

2. Cirrhose

Des études histologiques ont permis de définir plusieurs stades de fibrose en fonction de l'étendue des dommages hépatiques, allant de fibrose légère (F1) à sévère (F3). Le stade F4 quant à lui correspond à la cirrhose. La présence de cirrhose provoque d'importants remaniements tissulaires, avec l'apparition de nodules de régénération afin de compenser la perte importante d'hépatocytes (*Kleiner et al., 2005*). Elle perturbe le bon fonctionnement du foie et donne lieu à une insuffisance hépatique, une hypertension portale, et constitue un terrain favorable à l'émergence du CHC, même si de plus en plus de CHC surviennent sur un foie non-cirrhotique (*Llovet et al., 2021*).

B) Le carcinome hépatocellulaire

L'émergence de CHC à partir d'un foie non-cirrhotique suggère que les NAFLD présentent des caractéristiques favorisant ce processus (*Paradis et al., 2009*). En effet, de nombreuses études ont démontré que le stress oxydant, l'inflammation ou encore la signalisation endo-

et paracrine sont des facteurs promouvant le développement tumoral (*Anstee et al., 2019; Sutti and Albano, 2020*). Dans un modèle de souris MUP-uPA, où le stress du RE est constitutivement activé dans les hépatocytes, soumises à du HFD, des tumeurs émergent suite à l'activation de la voie NF κ B et à la production de TNF α (*Nakagawa et al., 2014*). Le stress oxydant et les ROS produites par les mitochondries dysfonctionnelles favorisent les lésions à l'ADN (*Nishida et al., 2016*), et parallèlement, la capacité des hépatocytes à réparer leur génome est altérée (*Tummala et al., 2014*). La lipotoxicité contribue également à entretenir le stress oxydant : la suractivation de la voie mTORC2 conduit à l'accumulation de glucosylcéramide et de cardiolipine, ce qui favorise l'apparition de tumeurs (*Guri et al., 2017*). Chez les patients NASH-CHC, l'expression de *Sqle* est augmentée, et chez la souris nourrie avec un régime riche en cholestérol, la surexpression de *Sqle* accélère l'apparition de tumeurs, démontrant ainsi le rôle important du métabolisme du cholestérol dans le développement tumoral (*D. Liu et al., 2018*). D'autre part, le microenvironnement pro-inflammatoire est aussi promoteur de tumeurs. Le TNF α et l'IL-6 ont été démontrés comme des facteurs pro-tumoraux dans un modèle murin de HFD préalablement stimulé avec le facteur carcinogène diéthylnitrosamine (DEN), puisque leur forte expression conduit à l'activation du facteur de transcription *signal transducer and activator of transcription 3* (STAT3) dans les hépatocytes (*Park et al., 2010*). STAT3 et STAT1 sont induits dans les modèles de régime et chez les patients stéatosiques ou NASH. De façon intéressante, STAT1 seul n'est pas promoteur de tumeurs mais participe activement à l'induction de l'inflammation, puisque dans les souris *Stat1*^{+/-} sous régime, l'inflammation est réduite mais pas l'incidence tumorale. Au contraire, STAT3 favorise le développement tumoral, puisque la réduction de son expression empêche l'émergence de nodules (*Grohmann et al., 2018*). Plusieurs cellules immunitaires participent également à la tumorigénèse : les NKT sécrétant la cytokine LIGHT et accentuant les dommages hépatiques, les lymphocytes CD8 suractivés (*Wolf et al., 2014*), les lymphocytes Th17 par leur sécrétion d'IL-17 (*Gomes et al., 2016*), mais également la perte de CD4 qui ne peuvent ainsi plus assurer une réponse antitumorale efficace (*C. Ma et al., 2016*).

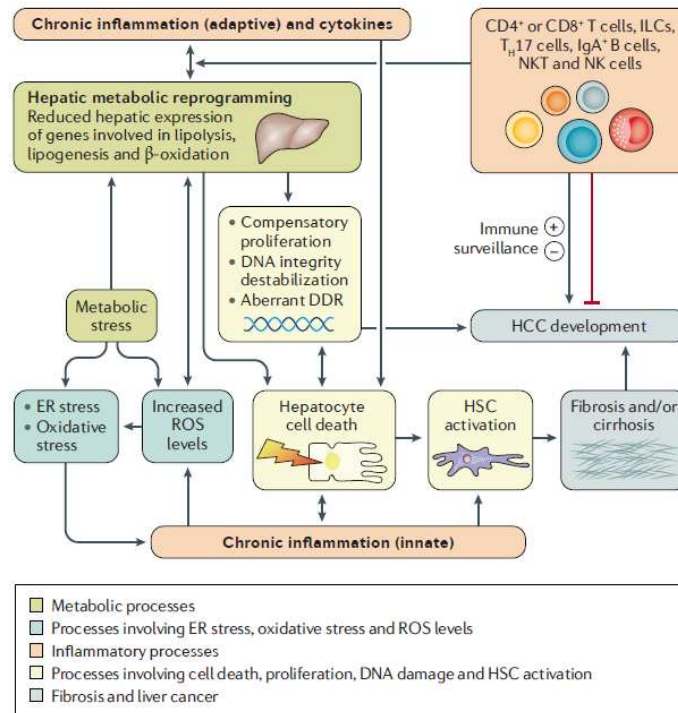


Figure 27. Principales voies de développement du CHC dans les NAFLD

Le stress métabolique provoqué par des apports alimentaires excessifs en acides gras et en glucose conduit à l'installation chronique d'un stress oxydatif et du RE, de la lipotoxicité et de l'inflammation. La synergie de ces différents processus conduit à des lésions tissulaires, qui elles-mêmes entretiennent l'inflammation et accentuent la réponse pro-fibrosante. Afin de maintenir son intégrité, le foie initie des foyers de régénération, mais le microenvironnement favorise les lésions à l'ADN et conduit à l'émergence du CHC. D'après [Anstee et al., 2019](#).

V. Solutions thérapeutiques pour les NAFLD

Malgré de nombreuses études, aucun traitement pharmacologique n'a encore été autorisé pour les NAFLD ([Ferguson and Finck, 2021](#)). La seule intervention possible pour l'instant est l'adaptation du régime alimentaire et du mode de vie du patient. En effet, une étude menée sur une cohorte de patients NASH qui ont adopté un changement de mode de vie durant un an a montré qu'une perte de poids importante était associée avec une plus forte régression de la NASH, et une amélioration de la fibrose ([Vilar-Gomez et al., 2015](#)). Toutefois, les découvertes récentes ont permis de mieux comprendre les mécanismes de mise en place et de progression des NAFLD, et plusieurs molécules sont en cours d'essai clinique. Cependant, la piste la plus prometteuse reste celle des modulateurs du métabolisme, puisque les essais visant à réduire l'inflammation et la fibrose ont fourni peu de résultats positifs et sont restés au stade d'essai pré-clinique ([Ferguson and Finck, 2021](#)). Plusieurs agonistes de FXR se sont prouvés efficaces. L'acide obéticholique administré à des patients NASH quotidiennement pendant 6 semaines a permis une amélioration de la sensibilité à l'insuline et une réduction

de l'inflammation et de la fibrose (*Mudaliar et al., 2013*). Une autre étude a administré ce même traitement mais pendant 72 semaines et a constaté les mêmes améliorations, cependant 23% des patients traités versus 6% des patients sous placebo ont développé un prurit, et leurs niveaux sériques de LDL cholestérol et d'insuline ont augmenté, ce qui incite à évaluer plus attentivement les risques associés à ce traitement (*Neuschwander-Tetri et al., 2015*). Il en est de même dans une autre étude comportant cette fois des patients NASH avec fibrose dans la cohorte (*Younossi et al., 2019*). Le cilofexor quant à lui cible spécifiquement le FXR entérique, et permet de réduire la stéatose chez les patients NASH, sans affecter les niveaux sériques de lipides ni causer une insulino-résistance (*Patel et al., 2020*). L'elafibranor est un agoniste de PPAR α et δ , qui interviennent dans l'oxydation des acides gras. L'administration de cette molécule durant un essai d'un an a permis une régression modérée de la NASH, mais avec des effets secondaires rénaux (*Ratziu et al., 2016*). Les inhibiteurs d'ACC firsocostat et PF-05221304 ont permis de réduire le contenu hépatique en lipides mais ont conduit à une élévation des taux de TAG sériques (*Esler et al., 2019; Lawitz et al., 2018*). Mais l'inhibition de FAS pendant 10 jours avec du TVB-2640 a permis de réduire la lipogenèse, l'accumulation hépatique de lipides et les niveaux sériques de transaminases, sans augmentation des TAG sériques (*Syed-Abdul et al., 2020*). Il en est de même dans la phase Ia pour cette molécule (*Loomba et al., 2021b*). Enfin, le traitement de patients NASH avec une forme modifiée du FGF21 réduit les niveaux de glucose et d'acides gras libres circulants et améliore la stéatose (*Sanyal et al., 2018*). Ces études présentent des résultats prometteurs, et l'intervention au niveau métabolique semble avoir des bénéfices au-delà de l'atteinte hépatique, avec la diminution des facteurs de risques cardiovasculaires, qui sont le plus souvent la cause de décès dans les patients NASH (*Ferguson and Finck, 2021*).

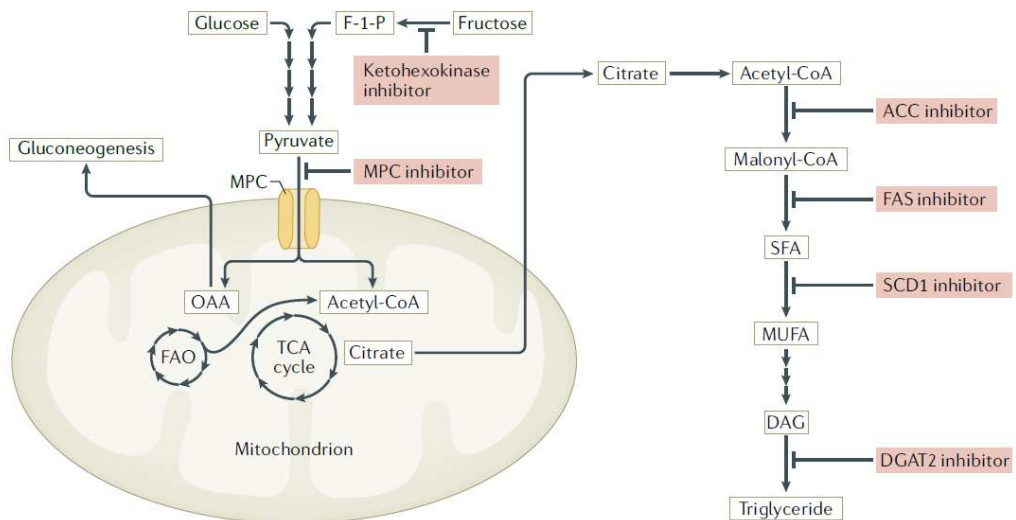


Figure 28. Le ciblage des voies métaboliques peut constituer une solution thérapeutique au cours des NAFLD

Plusieurs molécules ciblant le métabolisme hépatique sont en cours d'essai clinique. L'intervention au niveau métabolique peut permettre une réduction du stress exercé sur l'hépatocyte, et ainsi réduire l'inflammation et tous les effets adverses qui en découlent. D'après *Ferguson and Finck, 2021*.

CHAPITRE III : LECT2, UNE NOUVELLE HÉPATOKINE

La protéine *leucocyte cell-derived chemotaxin 2* (LECT2) a été identifiée pour la première fois en 1996 par Satoshi Yamagoe lors d'une étude dont le but était d'identifier des facteurs chemo-attractants sécrétés par des lignées tumorales (Yamagoe et al., 1996). Cette étude a mis en évidence que LECT2, une petite protéine de 16 kDa, était sécrétée par la lignée de lymphome humain SKW-3 après stimulation avec la phytohémagglutinine, et induisait la migration des neutrophiles *in vitro*. En 1998, le gène humain de LECT2 a été cloné (Yamagoe et al., 1998b). Toutefois, la protéine purifiée précédemment dans la lignée SKW-3 et celle purifiée à partir de foie humain étaient fortement similaires mais pas identiques. Ainsi, le LECT2 présent dans le milieu de culture de ces cellules provenait du sérum de veau foetal supplémentant le milieu, puisque la séquence protéique du LECT2 bovin correspond parfaitement à la séquence purifiée dans l'étude initiale (Yamagoe et al., 1998b).

I. Caractéristiques de LECT2

A) Structure

Chez l'Homme, le gène de LECT2 est localisé sur le chromosome 5q, et chez la souris sur le chromosome 13 (Yamagoe et al., 1998a, 1998c). Ce locus en particulier sur le chromosome 5 contient des gènes codant des protéines intervenant dans la réponse inflammatoire telles que le TGF β , ou encore les interleukines 4, 5, 9 et 13 (Jeronimo et al., 2007). Le gène humain contient 4 exons et 3 introns, tandis que le gène murin compte 5 exons et 4 introns (Yamagoe et al., 1998a, 1998c). Les deux gènes codent une protéine de 151 acides aminés, dont la forme mature de 133 acides aminés contient 6 cystéines hautement conservées chez les mammifères, aviens et amphibiens (Okumura et al., 2009). Des analyses spectrométriques ont mis en évidence la présence d'un site de liaison à un atome de zinc, ce qui rapproche structurellement LECT2 de la famille des M23 métalloendopeptidases, toutefois l'absence de site catalytique suggère que l'atome de zinc permettrait de stabiliser la protéine et empêcherait son oligodimérisation (Okumura et al., 2013a; Zheng et al., 2016). Malgré sa petite taille et la présence de cystéines, LECT2 n'est pas une cytokine, puisqu'elle ne présente pas de motif spécifique C-X_(n)-C ou C-C (Yamagoe et al., 1996).

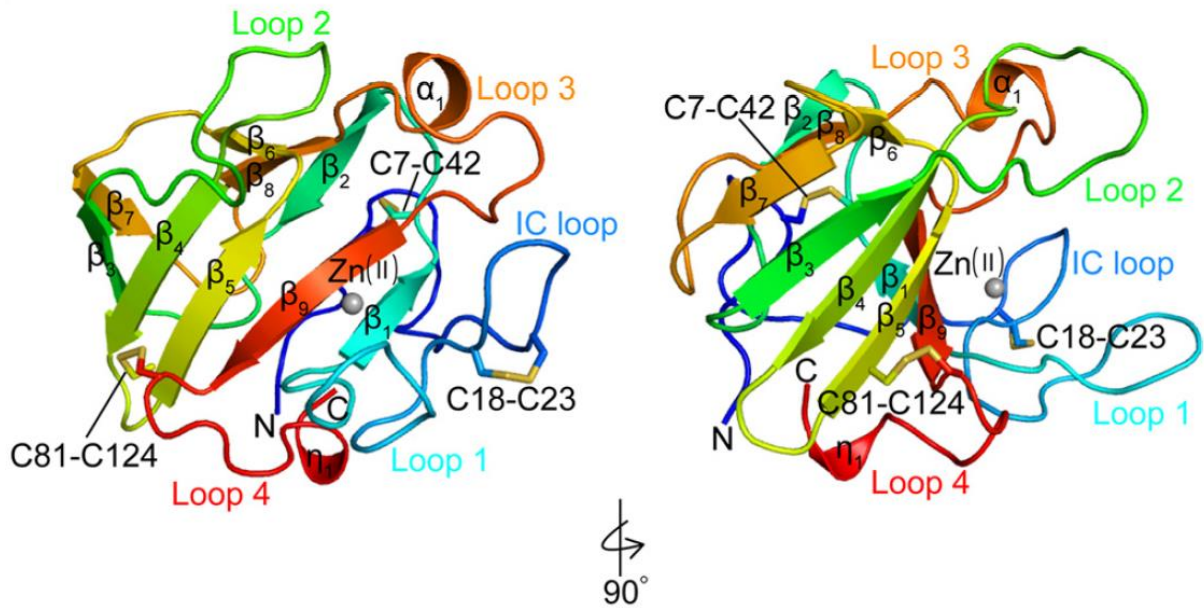


Figure 29. Structure tertiaire de LECT2

Adapté de (Zheng et al., 2016).

B) Expression de *Lect2*

Contrairement à ce que son nom laisse penser, LECT2 n'est pas sécrété par les leucocytes. Son expression a été détectée par *Northern blot* et immunohistochimie dans divers tissus, mais elle est spécifiquement restreinte au foie foetal et adulte chez l'Homme, et plus particulièrement dans les hépatocytes (Yamagoe et al., 1998b, 1997). L'expression de *Lect2* est régulée par la β -caténine. En effet, son promoteur contient des sites *lymphoid enhancer-binding factor/T cell factor* (LEF/TCF) spécifiques pour la liaison de la β -caténine à l'ADN. En conditions physiologiques, l'expression de *Lect2* suit le gradient d'activation de la β -caténine et est limitée aux premières rangées d'hépatocytes entourant la veine centro-lobulaire. Lors de l'activation oncogénique de la β -caténine, le territoire d'expression de *Lect2* est lui aussi étendu (Ovejero et al., 2004). De manière intéressante, il a été montré dans un modèle murin de cancer de l'intestin grêle présentant une activation constitutive de la β -caténine que LECT2 pouvait réprimer la voie Wnt/ β -caténine en agissant sur le facteur de transcription TCF4 (Phesse et al., 2008).

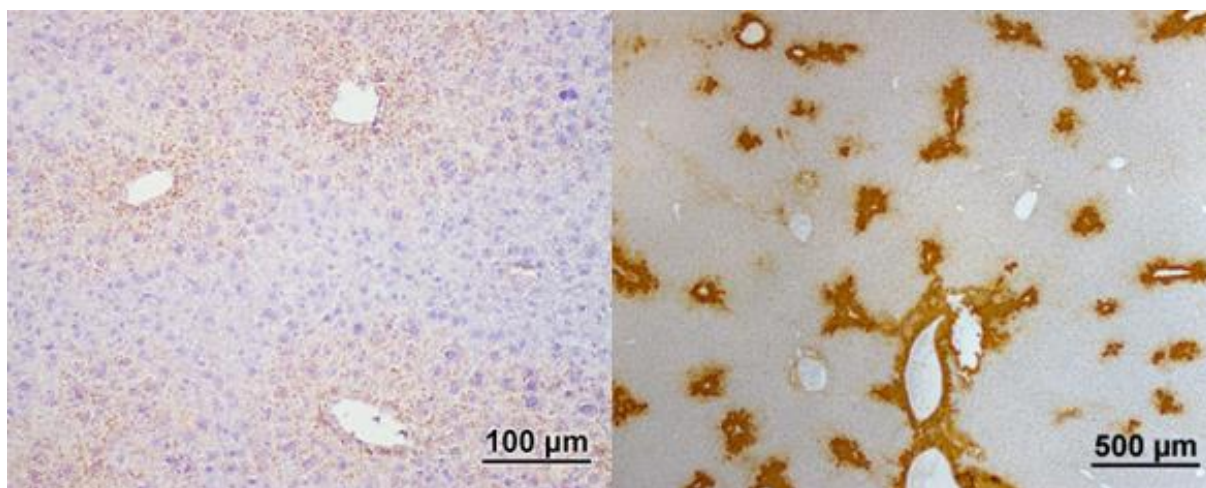


Figure 30. Territoire d'expression de LECT2 dans le parenchyme hépatique.

Détection de l'ARN de *Lect2* à l'aide d'une sonde RNAscope dans les hépatocytes bordant la veine centro-lobulaire (gauche) et immunomarquage de la glutamine synthase (GS), une cible connue de la β -caténine (droite).

C) Récepteurs de LECT2

Avant d'aborder les différents rôles de LECT2 dans l'organisme, il est intéressant de décrire les récepteurs qui ont été montrés comme répondant à une stimulation par LECT2.

1. DC-SIGN / CD209a

Le récepteur lectine de type C *dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3 grabbing non-integrin*, (DC-SIGN), aussi connu en tant que CD209a, est exprimé par certaines familles de cellules dendritiques et macrophages, et intervient dans la reconnaissance de glycanes (fucose, mannose *etc.*), la phagocytose, et la sécrétion de cytokines (*Garcia-Vallejo and Van Kooyk, 2013; Sancho and Reis E Sousa, 2012*). Son interaction avec LECT2 a été mise en évidence dans un modèle murin de septicémie provoquée par *Escherichia coli*. Le traitement avec du LECT2 recombinant (rLECT2) améliore la survie des animaux après infection en induisant une phagocytose accrue par les macrophages exprimant CD209a ainsi que la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IFN γ , l'IL1- β ou encore le TNF α (*Lu et al., 2013*). Ces résultats ont également été démontrés dans des modèles de poisson ayu (*Chen et al., 2010; H.-L. Ma et al., 2016*). D'un point de vue moléculaire, LECT2 induit la phosphorylation de la Ser28 de CD209a à la surface des macrophages, ce qui provoque la phosphorylation activatrice de la kinase Raf-1, qui elle-même phosphoryle la sous-unité p65 de NF κ B, induisant ainsi une réponse pro-inflammatoire et la production d'oxyde nitrique (NO) (*Shen et al., 2016*). Plus récemment,

une étude *in vitro* d'infection à *Helicobacter pylori* a montré que LECT2 était nécessaire à la maturation des cellules dendritiques via CD209a. De manière similaire aux macrophages, la liaison de LECT2 sur CD209a induit la phosphorylation de JNK et p38, mais pas celle de p65 (Zhang et al., 2023).

2. VEGFR2

Le *vascular endothelial growth factor receptor 2* (VEGFR2) intervient dans le processus d'angiogenèse (Wang et al., 2020). *In vitro*, rLECT2 inhibe la formation de vaisseaux par les cellules HUVEC, même en présence de VEGF. En effet, la liaison directe de LECT2 au VEGFR2 empêche la phosphorylation de celui-ci, et bloque donc la signalisation qui en découle par les kinases ERK et Akt. Cela conduit à des tumeurs moins nombreuses et plus petites dans un modèle de xénogreffe (Chen et al., 2016).

3. cMET

Le récepteur *cellular mesenchymal-epithelial transition* (cMET), une fois activé par son ligand, *hepatocyte growth factor* (HGF), régule les voies de prolifération cellulaire par son activité tyrosine kinase (Y. Zhao et al., 2022). Il a été montré dans plusieurs lignées cellulaires d'hépatomes (SK-Hep1, HUH7 et HepG2) que LECT2 pouvait se lier à cMET de manière non-compétitive, permettant encore la liaison d'HGF. Ceci inhibe la signalisation de cMET en induisant le recrutement de la phosphotyrosine phosphatase 1B (PTP1B) qui empêche la cascade de phosphorylation médiée par Raf1/ERK. Ainsi, la prolifération vasculaire est réduite, ce qui limite la diffusion de métastases, comme il a été montré dans un modèle de xénogreffe (C.-K. Chen et al., 2014).

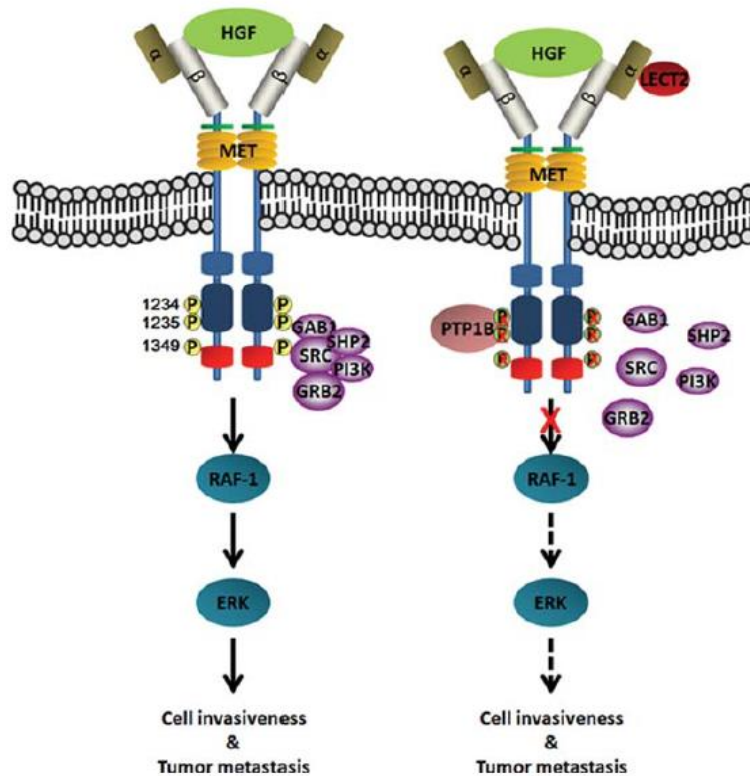


Figure 31. LECT2 réduit l'angiogénèse en empêchant la signalisation d'HGF sur cMET

LECT2 et HGF ont des sites de liaisons distincts sur cMET, toutefois LECT2 induit le recrutement de la phosphatase PTP1B au niveau du domaine intracellulaire de cMET et empêche le recrutement des protéines adaptatrices, réduisant ainsi sa signalisation pro-angiogénique via Raf1/ERK. D'après C.-K. Chen et al., 2014.

4. Tie1/Tie2

La famille de récepteurs *tyrosine kinase with immunoglobulin-like and EGF like domains* (Tie) est constituée de Tie1 et Tie2. Ils sont exprimés par les cellules endothéliales et participent à l'angiogénèse embryonnaire et post-natale médiée par les angiopoïétines. L'effecteur principal est Tie2, qui transduit ses signaux en s'homodimérisant, ou en s'hétérodimérisant avec Tie1, qui est considéré comme un récepteur orphelin (Bilimoria and Singh, 2019). En 2019, il a été montré par co-immunoprécipitation dans la lignée épithéliale 293T que LECT2 est un ligand direct de Tie1 (Xu et al., 2019). Leur interaction conduit à la déphosphorylation de Tie1, ce qui perturbe l'hétérodimère Tie1/Tie2 et favorise les interactions Tie2/Tie2. La signalisation sous-jacente conduit à l'activation de PPAR γ , qui induit la capillarisation des LSECs dans les zones péri-portales et favorise le développement de fibrose. Toutefois, les effets pro-fibrosants de LECT2 semblent être spécifiquement provoqués par sa liaison avec Tie1. En effet, le blocage pharmacologique de VEGFR2 et cMET par le golvatinib dans la lignée endothéliale EA.hy926 n'a pas affecté la capacité de LECT2 à inhiber la migration et

la formation de tubes par ces cellules. De même, l'inhibition *in vivo* du VEGFR2 et de CD209a n'affecte pas la gravité de la fibrose (Xu et al., 2019).

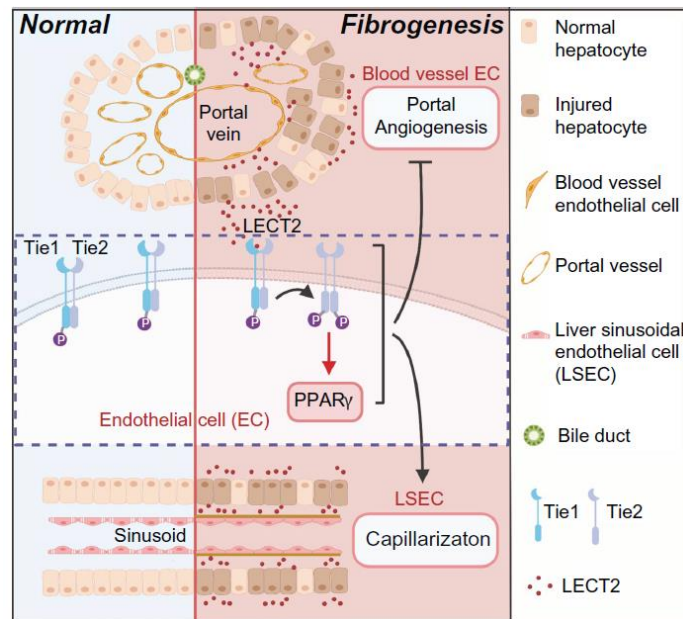


Figure 32. L'interaction LECT2/Tie1 provoque la fibrose hépatique

L'expression de LECT2 est induite dans un contexte de réponse fibrosante. Il peut alors se fixer sur Tie1, induire sa déphosphorylation et déstabiliser les dimères Tie1/Tie2. Cela provoque une signalisation PPAR γ au niveau des LSEC qui vont se capillariser et favoriser l'activation des HSC, conduisant au dépôt de collagène dans la zone péri-portale du lobule hépatique. D'après Su and Iwakiri, 2020.

II. Fonctions de LECT2 dans l'organisme

Depuis sa découverte, LECT2 a été étudié dans différents contextes, et plusieurs fonctions lui ont été attribuées. On peut classer de manière générale ces fonctions dans deux domaines majeurs, le métabolisme et l'immunité.

A) Rôle dans le métabolisme

1. Dyslipidémie et syndrome métabolique

La première évidence de l'implication de LECT2 dans le métabolisme date de 2013, lorsque Okumura *et al.* ont établi une corrélation positive entre le niveau sérique de LECT2 et différents paramètres biologiques tels que l'obésité et la présence de stéatose hépatique dans une cohorte de patients (Okumura *et al.*, 2013b). Ces observations ont été confirmées par d'autres études chez les patients, confortant le lien entre expression de LECT2 et NAFLD (Tanisawa *et al.*, 2017; Yoo *et al.*, 2017). Plus récemment, il a été montré chez la souris que

l'inhibition de LECT2 par siRNA *in vivo* dans un modèle de HFD permet de réduire la stéatose par la diminution de la lipogenèse et l'induction de la β -oxydation, tandis que sa surexpression a l'effet inverse (J. Wang *et al.*, 2021).

2. Résistance à l'insuline

Il a été suggéré que LECT2 puisse être une hépatokine : dans un modèle murin de NAFLD induite par le HFD, LECT2 induit l'insulinorésistance dans le muscle squelettique (Lan *et al.*, 2014). En effet, la délétion de LECT2 chez les souris obèses améliore la sensibilité à l'insuline dans le muscle. De plus, l'administration de rLECT2 ou sa surexpression dans la lignée de myoblastes C2C12 conduit à l'inactivation d'Akt et l'activation de JNK. Sur la base de ces observations, Jung *et al.* ont investigué l'effet de LECT2 sur les adipocytes à travers une étude *in vitro* avec la lignée d'adipocytes 3T3-L1. Le traitement par du rLECT2 provoque dans ces cellules une résistance à l'insuline à travers l'inhibition d'IRS1/Akt. De plus, les cellules traitées par du rLECT2 contiennent plus de lipides, et présentent une expression plus importante des gènes de la lipogenèse *Srebp1c* et *Scd1*. Enfin, LECT2 induit la phosphorylation de JNK et p38, ce qui conduit à l'activation de NF κ B et à la sécrétion de TNF α et de la chimiokine CCL2 (Jung *et al.*, 2018). Dans un autre modèle cellulaire d'hépatocytes HepG2, LECT2 favorise la phosphorylation de mTOR, le clivage de SREBP1c, l'accumulation de lipides et la mise en place de l'insulinorésistance, et ces effets sont atténués par l'inhibition de JNK (Hwang *et al.*, 2015b). L'administration *in vivo* et *in vitro* de gemigliptine, un inhibiteur de la dipeptyl peptidase IV, réduit l'expression de LECT2 tout en améliorant la stéatose et la sensibilité à l'insuline. De manière intéressante, la délétion de *phosphatase and tensin homolog* (PTEN) dans l'hépatocyte *in vivo* améliore la sensibilité à l'insuline, et parmi les hépatokines dont l'expression est dérégulée, on retrouve une diminution en LECT2 (Berthou *et al.*, 2022). Chez l'Homme, LECT2 est rapidement induit lorsque l'alimentation devient hyperlipidique et hypercalorique (Willis *et al.*, 2020), ce qui appuie l'hypothèse que LECT2 puisse être une hépatokine.

3. Athérosclérose

Parmi les comorbidités des NAFLD, on retrouve l'athérosclérose, qui est souvent la cause de mortalité des patients. Le rôle de LECT2 dans l'athérosclérose a été peu étudié, et les résultats peuvent être contradictoires. Dans un modèle *in vitro* où des cellules endothéliales HUVEC et myéloïdes THP-1 ont été traitées par du rLECT2, les niveaux de phosphorylation

de JNK, ainsi que l'expression d'ICAM-1, TNF α , IL-1 β et CCL2 sont augmentés, et ce de manière CD209a-dépendante (*Hwang et al., 2015a*). Cependant, l'administration de LECT2 à des souris *Apoe*^{-/-} sous *Western diet* permet de réduire les taux sériques de LDL et de cholestérol, l'expression de cytokines pro-inflammatoires et la formation de plaques d'athérome, suggérant plutôt un rôle protecteur de LECT2 dans ce contexte (*He et al., 2019*).

B) Fonctions immunitaires

1. Régulation de l'inflammation

LECT2 intervient dans la régulation de l'inflammation de différentes manières. Comme abordé précédemment (§IC1), il améliore la réponse à une infection bactérienne en induisant la phagocytose par les macrophages et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires via sa liaison sur CD209a (*Lu et al., 2013; Shen et al., 2016; Zhang et al., 2023*). Chez le poisson, il a été montré que LECT2 pouvait interagir avec la transferrine, ce qui pourrait constituer un mécanisme de défense antibactérien (*Chen et al., 2009*). D'autre part, l'interaction entre LECT2 et CD209a à la surface des cellules dendritiques chez la souris participe à leur maturation. Le traitement de cellules dendritiques avec du rLECT2 réduit la sécrétion de la cytokine pro-inflammatoire IL-23p40 et induit la production d'IL-10 qui a un effet anti-inflammatoire. Par ailleurs, la coculture de cellules dendritiques prétraitées avec du rLECT2 et stimulées par *H. pylori* avec des lymphocytes T naïfs conduit à une faible différenciation de ces derniers en cellules Th1 et Th17 et favorise la formation de Tregs (*Zhang et al., 2023*). Il a également été montré que LECT2 pouvait moduler l'hématopoïèse à travers CD209a. En effet, les macrophages stimulés par LECT2 réduisent leur sécrétion de TNF α , ce qui favorise la maturation et la différenciation des cellules souches hématopoïétiques en cellules myéloïdes (*Lu et al., 2016*).

Plus récemment, dans un modèle d'agression hépatique aigue à l'aide de CCl4 ou de concanavaline A, l'expression de LECT2 est augmentée, et l'absence de LECT2 est corrélée avec des lésions hépatiques moins sévères. De plus, l'infiltration de cellules immunitaires semble être modulée par LECT2, puisqu'en son absence, dans le modèle CCL4, on observe moins de cellules NK/NKT et de macrophages parmi les cellules infiltrées, tandis que dans le modèle à la concanavaline A, on observe plus d'infiltration de neutrophiles, lymphocytes CD4 et CD8, et moins de macrophages comparativement aux contrôles (*Xie et al., 2022*).

Dans un contexte métabolique, la surexpression de LECT2 induit l'expression du TNF α et de CCL2, tandis que son inhibition la réduit ([J. Wang et al., 2021](#)).

Enfin, LECT2 a été impliqué dans la réponse à la polyarthrite rhumatoïde. En effet, la déficience en LECT2 aggrave le phénotype dans un modèle murin de polyarthrite induite par des anticorps ciblant le collagène ([Okumura et al., 2008](#)). Chez l'Homme, le polymorphisme Val58Ile de LECT2 est directement associé avec la sévérité de la pathologie ([Kameoka et al., 2000](#)).

2. Homéostasie des NKT

LECT2 régule l'homéostasie des NKT dans le foie. En effet, les souris *Lect2*^{-/-} présentent deux fois plus de NKT hépatiques comparativement à des souris *wild type*, ce qui n'affecte ni leur viabilité, ni leur état général. Cependant, elles sont beaucoup plus sensibles à l'hépatite induite par la concanavaline A, puisqu'elles présentent des lésions plus étendues et une expression d'IL-4 et de FasL plus importante ([Saito et al., 2004](#)).

3. Rôle dans le CHC et autres cancers

L'expression de LECT2 étant dépendante de la β -caténine, il a été étudié dans les cas de CHC présentant des mutations activatrices de cette dernière. Chez les patients, l'expression de LECT2 est induite dans un sous-groupe de CHC et les hépatoblastomes où la β -caténine est activée ([Ovejero et al., 2004](#)). Les travaux de notre équipe ont démontré que LECT2 est particulièrement important dans la mise en place de la réponse antitumorale. Dans un modèle murin d'activation oncogénique de la β -caténine, l'absence de LECT2 conduit à l'émergence de tumeurs malignes et à la dissémination de métastases pulmonaires, associées à une réponse antitumorale inefficace des iNKT en raison d'une suractivation de la réponse inflammatoire ([Anson et al., 2012](#)). De plus, dans ce même modèle, l'invalidation de *Lect2* favorise l'accumulation de cellules myéloïdes exprimant des facteurs immunosuppresseurs et pro-tumoraux, ce qui favorise la dédifférenciation des hépatocytes et la formation de métastases pulmonaires ([L'Hermitte et al., 2019](#)). Cette dernière étude a également mis en évidence que la perte d'expression de *Lect2* dans la tumorigénèse des CHC était associée avec un phénotype dédifférencié et fortement infiltré. Enfin, d'autres études ont confirmé cette corrélation entre niveaux hépatiques de LECT2 et gravité du CHC ([Okabe et al., 2014](#); [Ong et al., 2011](#); [Ouyang et al., 2020](#)).

LECT2 a été également identifié comme un acteur modulant l'inflammation dans d'autres types de tumeurs. Par exemple, il a été montré que la délétion de *Lect2* associée à une activation partielle de la β -caténine dans l'intestin favorise le développement de carcinomes colorectaux en créant un microenvironnement plus permissif et moins inflammatoire (*Greenow et al., 2018*). Dans l'adénocarcinome pancréatique, l'expression de *Lect2* est négativement corrélée avec la taille du nodule, et la perte d'expression de *Lect2* dans la tumeur est associée avec un mauvais pronostic (*Li et al., 2021*). La diminution de LECT2 dans les tumeurs favorise la transition épithélio-mésenchymateuse et la dissémination de métastases. Moléculairement, LECT2 bloque l'activation du facteur de transcription FOXM1 en se liant à cMET et en inhibant la signalisation de l'HGF (*Li et al., 2021*). Il en est de même dans le cancer bronchique non à petites cellules où LECT2 réduit la croissance tumorale en bloquant la signalisation de cMET et de l'EGFR (*Hung et al., 2018*).

C) Rôle dans la fibrose hépatique

Comme abordé au §IC4, LECT2 favorise le développement de fibrose péri-portale à travers sa liaison avec Tie1 (*Xu et al., 2019*). Dans plusieurs modèles de fibrose hépatique (injection chronique de CCl₄, ligature des canaux biliaires, régime MCD), l'expression de LECT2 est augmentée. Ces mêmes protocoles appliqués à des souris déficientes en LECT2 conduisent à un développement de fibrose moindre, tandis que la surexpression de LECT2 aggrave la fibrose. Ces observations ont également été validées chez les patients présentant de la fibrose (*Xu et al., 2019*). Plus récemment, il a été montré que LECT2 était également un marqueur efficace pour caractériser la progression de la fibrose chez les patients souffrant d'hépatite B chronique (*Xu et al., 2021*) et d'atrésie biliaire (*J. Zhao et al., 2022*). Il est intéressant de noter qu'une étude portant sur la cirrhose alcoolique a montré que les niveaux sériques de LECT2 diminuaient avec la progression de la fibrose (*Sak et al., 2021*). L'induction de LECT2 dans la fibrose pourrait être dépendante de la β -caténine, puisque dans un modèle de fibrose par ligature des canaux biliaires, l'inhibition de l'interaction β -caténine/TCF4 par l'utilisation d'ICG-001 et LF3 réduit l'expression de LECT2 et les dépôts de collagène (*Gao et al., 2023*). Le TGF β 1 pourrait également induire l'expression de LECT2, comme il a été démontré dans un modèle *in vitro* à l'aide d'hépatocytes foétaux L-02 (*J. Zhao et al., 2022*).

RÉSULTATS

OBJECTIFS

Ainsi, le foie est au centre de l'homéostasie métabolique de l'organisme. Plusieurs niveaux de régulation permettent de maintenir un équilibre en fonction des apports et des dépenses énergétiques, en agissant notamment sur le stockage et le catabolisme des ressources disponibles, à savoir les acides gras et le glucose. Cependant, un déséquilibre provoqué par une alimentation où ces deux éléments sont en excès conduit vers des réponses physiologiques inadéquates, favorisant le stockage à la dépense. Le tissu adipeux se développe et le foie devient stéatosique. Avec la persistance de l'excès, plusieurs événements déclenchent l'inflammation, on parle alors de stéatohépatite. Sans intervention diététique, le foie continue d'être lésé et peut subir des événements mutationnels conduisant à l'apparition de tumeurs, ou perdre ses fonctions en raison d'une réponse fibrogénique constamment stimulée.

On peut identifier plusieurs étapes clé dans la mise en place des NAFLD. Premièrement, la dérégulation du métabolisme des acides gras, que ce soit par l'afflux alimentaire, la lipogenèse *de novo*, l'altération de l'oxydation et la lipolyse du tissu adipeux, contribue à l'augmentation du stockage hépatique sous forme de gouttelettes lipidiques. La résistance à l'insuline favorise et entretient la stéatose, par des mécanismes encore méconnus, en induisant la lipogenèse via les facteurs de transcription SREBP1c, ChREBP et LXR qui sont activés par l'insuline, le glucose et les oxystérols respectivement. Enfin, la dérégulation métabolique provoque des dysfonctionnements notamment au niveau du RE et des mitochondries, que ce soit par la production de ROS, ou par l'afflux de lipides lipotoxiques, qui provoquent des lésions cellulaires et déclenchent la réponse inflammatoire et fibrogénique. En réponse à la résistance hépatique à l'insuline, le foie sécrète des hépatokines qui, par leur action paracrine, stimulent d'autres organes ayant des propriétés métaboliques, tels que le tissu adipeux ou musculaire. Récemment, LECT2 a été proposé comme une hépatokine induisant l'insulinorésistance dans le muscle squelettique et le tissu adipeux via l'activation de JNK, sans qu'on connaisse plus précisément les mécanismes moléculaires.

À partir de ces connaissances, une première question se pose : quel est le rôle de LECT2 dans le métabolisme des acides gras dans le foie ? Cette question a fait l'objet des travaux de thèse de Sandrine Pham qui, à l'aide d'un modèle murin déficient en LECT2 (*Lect2^{-/-}*) et d'un

sauvetage phénotypique à l'aide d'une construction virale AAV8-*Lect2* (*Lect2^{RESCUE}*), a démontré que LECT2 participe à la régulation de la lipogenèse *de novo* et à l'homéostasie du cholestérol dans des conditions physiologiques. De plus, en utilisant des modèles de stéatose induite par des régimes riches en gras, elle a pu montrer que l'expression de *Lect2* était induite augmentée chez la souris. Enfin, en collaboration avec le Docteur Philippe Gual (Centre Méditerranéen de Médecine Moléculaire, Nice), l'expression hépatique de *Lect2* a été mesurée chez des patients obèses avec ou sans stéatose, et les résultats obtenus montrent également une induction de *Lect2* chez les patients stéatosiques. Ces résultats sont présentés dans les 3 premières figures de la publication dont Sandrine Pham et moi partageons la place de première autrice.

Les travaux de Sandrine Pham ont ouvert la voie à deux axes de recherche que j'ai pu poursuivre au cours de ma thèse. Premièrement, j'ai voulu comprendre pourquoi LECT2 était induit par la stéatose, et quels sont les mécanismes moléculaires impliqués. Pour répondre à cette problématique, j'ai utilisé des souris contrôle (CTRL) et *Lect2^{-/-}* nourries avec du *High Fat Diet* pendant 20 semaines. En deuxième lieu, j'ai voulu explorer le rôle de LECT2 dans la régulation du métabolisme du cholestérol, à l'aide d'un régime *High Fat High Cholesterol*. Enfin, Sandrine Pham puis moi-même avons investigué l'effet d'une tumorigénèse induite par du *Choline-Deficient High Fat Diet* sur des souris *Lect2^{-/-}*.

Lect2 regulates both cholesterol metabolism and inflammation during NAFLD.

Pham S.^{1, 12£}, Pophillat C.^{1£}, Gonçalves-Araujo J.¹, Midrouillet P.¹, Cordier P.¹, Benhamed F.², , Galy-Fauroux I.¹, L'Hermitte A.¹, Nemazanyy I.³, Lhomme M.⁴, Bonnafous S.⁵, Judor JP.⁶, Conchon S.⁶, Cadoux M.¹, Lagouge M.⁷, Pais de Barros JP.⁸, Celton-Morizur S.¹, Yamagoe S.⁹, Tran A.⁵, Gual P.⁵, Postic C.², Desdouets C.¹, Paul C.^{10#}, Couty JP.^{1#*}.

¹ Centre de Recherche des Cordeliers, INSERM U1138, Sorbonne Université, Université Paris-Cité, Team "Proliferation Stress and Liver Physiopathology", 75006 Paris, France.

² Institut Cochin, INSERM U1016, CNRS, Université de Paris, Team "Insulin signaling, glucose sensing and glucotoxicity", 75014 Paris, France.

³ Platform for Metabolic Analyses, Structure Fédérative de Recherche Necker, INSERM US24/CNRS UAR 3633, 75015 Paris, France.

⁴ IHU ICAN (ICAN Omics and ICAN I/O), Foundation for Innovation in Cardiometabolism and Nutrition, Pitié-Salpêtrière Hospital, 75013 Paris, France.

⁵ Centre Méditerranéen de Médecine Moléculaire, INSERM U1065, Université Côte d'Azur, CHU, Team "Chronic liver diseases associated with obesity and alcohol", Nice, France.

⁶ Centre de Recherche en Transplantation et Immunologie, INSERM U1064, ITUN, Université de Nantes, 44000 Nantes, France.

⁷ Centre de Recherche des Cordeliers, INSERM, Sorbonne Université, Université Paris-Cité, Team "Metabolic diseases, diabetes and comorbidities", 75006 Paris, France.

⁸ Team LIPNESS, INSERM / University of Bourgogne Franche-Comté LNC UMR1231 and LipSTIC LabEx, UFR Sciences de Santé, Dijon, France

⁹ Department of Bioactive Molecules, National Institute of Infectious Diseases, Shinjuku-ku, Tokyo, Japan.

¹⁰ Team Immunology and Cancer Immunotherapy, EPHE, PSL Research University, 75000 Paris, France ; LIIC, EA7269, Université de Bourgogne Franche Comté, 21000 Dijon, France.

£, # These authors contributed equally to this work.

***Corresponding author**

Jean-Pierre COUTY, Ph.D

Centre de Recherche des Cordeliers (CRC), UMRS INSERM U1138, Sorbonne Université, USPC, Université Paris-Cité, F-75006 Paris, France

Département Génome et Cancer, Building A,

15 Rue de L'Ecole de Médecine, 75006 Paris, France;

Phone: 33 1 44 27 69 06

E-mail: jean-pierre.couty@inserm.fr

CONFLICTS OF INTEREST: All authors concur with submission and affirm that the material submitted for publication, has not been previously reported and is not under consideration for publication elsewhere. The authors also disclose no conflicts of interest.

SUMMARY

The liver is the privileged site of metabolic regulations that must be tightly coordinated to buffer metabolic imbalance to preserve homeostasis. Alterations of these processes can promote steatosis, a key feature of non-alcoholic fatty liver diseases (NAFLD) that represent the new worldwide epidemic threat. Here, we first demonstrate in standard diet conditions, that Lect2, a liver secreted factor, mediates its regulatory effects on hepatic lipogenesis and cholesterol homeostasis specifically through an LXR-SREBP1c-dependent signaling. Second, during HFD conditions, we evidence that Lect2 regulates cholesterol homeostasis and protects against mitochondrial dysfunction. Importantly, we find that Lect2 reduces NASH severity by mitigating both the inflammatory response and lipotoxicity in cholesterol overload diet. Finally, our data provide evidence that Lect2, through its dual immune and metabolic properties, is a critical actor during NAFL/NASH sequence and harbors tumor suppressive functions in mice, as its long-term ablation facilitates hepatic tumor development. Collectively, our work highlights that Lect2 could constitute an innovative target for NAFLD diagnosis or treatment.

INTRODUCTION

The liver is a privileged anatomical site in which several key metabolic reactions take place in order to maintain energy homeostasis¹. Hepatic lipid content is tightly regulated by the interplay between fatty acid delivery and uptake, *de novo* fatty acid synthesis (lipogenesis), oxidation and secretion of lipids. Alterations in the equilibrium of one or more of these processes can promote hepatic steatosis², a hallmark of non-alcoholic fatty liver diseases (NAFLD) considered as the hepatic manifestation of metabolic syndrome and obesity³. NAFLD prevalence is 25% in the general population and reaches about 80% in morbidly obese individuals⁴. Considering a global rise in obesity and type 2 diabetes, NAFLD is projected to become the leading cause of hepatocellular carcinoma (HCC) in western countries⁵⁻⁷. NAFLD encompass a spectrum of liver conditions ranging from simple hepatic steatosis or non-alcoholic fatty liver (NAFL) to the concomitant presence of hepatocellular damage (ballooning), Mallory-Denk bodies formation, and lobular necro-inflammation, defining non-alcoholic steatohepatitis (NASH)^{8,9}. While NAFL is associated with low risk of adverse outcomes, NASH has the potential to progress to more severe stages including fibrotic NASH, advanced fibrosis, cirrhosis, and HCC¹⁰. NAFLD is a complex disease, the development and progression of which require multiple parallel hits (dietary habits, environmental factors) in genetically predisposed individuals¹¹. One of the main pathogenic mechanisms observed in NAFLD pathogenesis is hepatocyte lipotoxicity¹¹. While triglyceride accumulation (e.g., steatosis) is thought to be relatively benign, hepatocyte lipotoxicity induced by bio-active lipid species can result in cellular damage, inflammation, and cell death. These changes within the liver place extra metabolic stress on various organelles, such as mitochondria and the endoplasmic reticulum, triggering a cascade of stress-induced responses, including the generation of reactive oxygen species (ROS)¹². This leads to further cell injury, culminating in inflammation, programmed cell death (apoptosis), and fibrotic remodeling¹³. The progression or resolution of NASH depends on the balance between cell injury and regeneration¹⁴. Interestingly, high levels of lipogenesis, liver damage, and inflammation have been identified as key drivers of the development of murine HCC¹⁵⁻¹⁷.

At the molecular level, *de novo* lipogenesis is mainly orchestrated by two transcription factors : sterol regulatory element binding protein 1c (SREBP1c)¹⁸ and carbohydrate responsive element binding protein (ChREBP)¹⁹, both controlled at the transcriptional level by the liver X receptor (LXR) signaling^{20,21}. In addition to its role in lipogenesis, LXR which is mainly activated by oxysterol species, plays also a major role in regulating cholesterol uptake and export through bile acids²². Conversely, SREBP2 is another key transcription factor governing cholesterol biosynthesis through the mevalonate pathway, and as LXR, it is also regulated by oxysterols²³. Of note, cholesterol metabolism is a major driver of tumorigenesis as it acts both at the level of tumor cells and inflammatory response²⁴.

In response to the establishment of steatosis, the liver releases specific factors named hepatokines into the bloodstream, to orchestrate a finely tuned multi-organ metabolic response. Among them, some were shown to harbor positive effects on insulin resistance and/or visceral adiposity and recently, leukocyte cell-derived chemotaxin 2 (Lect2) has been suggested as a new member of this family²⁵.

Lect2 is a liver-secreted protein originally described as a chemokine-like factor²⁶ and as a critical actor of the liver immune microenvironment, regulating natural killer T cells homeostasis²⁷. Recently, using spontaneous liver cancer mouse models, we provided compelling evidence that Lect2 exerts anti-inflammatory and strong tumor-suppressive functions through its impact on macrophage polarization and function^{28,29}. Recent data demonstrated that Lect2 affect liver angiogenesis, liver fibrosis^{30,31} and has more recently been involved in the control of LCMV infection³². These findings suggest that Lect2 is a key player of liver physiopathology. Further studies revealed that Lect2 is involved in metabolic disorders as it impairs muscle insulin sensitivity in a JNK-dependent manner³³. While patients' serum levels of Lect2 were positively correlated with features of obesity and steatosis³⁴, the mechanisms by which Lect2 exerts its effects in the liver and more importantly contribute to steatosis development remain unexplored.

In the current study, we investigated the hepatic role of Lect2 in physiology and during NAFLD onset and progression. At the molecular level, we demonstrate that Lect2, through an LXR/SREBP1c-dependent pathway, is a regulator of *de novo*

lipogenesis and cholesterol homeostasis. Moreover, our data reveal that Lect2 displays immunomodulatory and metabolic properties and attenuates NASH progression towards tumor development.

RESULTS

Lect2 modulates lipogenic response through SREBP1c signaling.

During our previous study exploring the role of Lect2 in HCC tumorigenesis²⁹, we performed a transcriptomic analysis in steady state conditions comparing *Lect2*-deficient (*Lect2*^{-/-}) to control (CTRL) livers. Interestingly, gene set enrichment analysis (GSEA) revealed molecular signatures linked to lipid metabolism, notably cholesterol metabolism and SREBF factors (**Figure 1A, 1B, S1A**).

These data prompted us to investigate the role displayed by Lect2 in hepatocyte metabolism. Although Lect2 has been linked to steatosis³³, its effects in hepatic lipid metabolism remained to be determined.

First, we investigated the specific effects of Lect2 on *de novo* lipogenesis under physiological conditions. To this end, we performed fasting or refeeding challenges in CTRL and *Lect2*^{-/-} mice (**Figure 1C**). There were no significant differences in blood glucose concentration and body weight between CTRL and *Lect2*^{-/-} mice, under fasted or refed conditions (**Figure 1D**). In addition, in refed control mice, we found that *Lect2* expression was increased (**Figure 1D**). While no change in liver histology was evidenced in the absence of Lect2 (**Figure 1E**), a slight increase in lipid content was observed after oil red O staining (**Figure 1F**) and confirmed by hepatic triglyceride assay (**Figure 1G**).

While refeeding induces an upregulation of lipogenesis regulator *Srebp1c*, its expression level remained unchanged in Lect2 deficient compared to CTRL livers (**Figure S1B, S1C**). However, we observed an upregulation of lipogenic genes in Lect2-deficient mice in the fasting state (**Figure 1H**). Indeed, transcripts of *Srebp1c*, acetyl-CoA carboxylase (*Acc*) and fatty acid synthase (*Fas*) were significantly upregulated in *Lect2*^{-/-} livers compared to CTRL. Of note, the transcriptional level of

the glucose sensor *ChREBP* remained unchanged under these conditions (**Figure 1H**). Accordingly, ACC protein content was increased in *Lect2*^{-/-} fasted livers compared to CTRL (**Figure S1C**). Finally, to mimic fasting conditions, we cultured primary hepatocytes in a low glucose medium deprived of insulin for 36 hours and found a drastic accumulation of lipid droplets in *Lect2*^{-/-} hepatocytes compared to CTRL (**Figure 1I, S1D**).

Altogether, our data suggest that *Lect2* participates in the control of hepatic lipogenic response through SREBP1c pathway.

To get more insight into the molecular mechanisms by which *Lect2* regulates lipid metabolism and notably cholesterol homeostasis, we analyzed in more detail the cholesterol signature revealed by our transcriptomic analysis (**Figure 1A**). Interestingly, both cholesterol biosynthesis (*Hmgcr*, *Sqle*, *Mvd*) and catabolism (*Cyp7a1*, *Cyp8b1*) and export through bile acids (*Abcg5*, *Abcg8*, *Abcb4*, *Abcb11*) pathways were substantially upregulated (**Figure 2A**) without affecting total cholesterol levels measured by lipidomic analysis (**Figure 2B**).

This prompted us to investigate LXR signaling, as LXR/SREBP1c axis was reported as a major signaling pathway controlling lipogenesis and cholesterol metabolism^{20,35}. Accordingly, we found, through an *ex vivo* LXRE-luciferase transfection assay (**Figure 2C**), a marked increase in LXR activity in *Lect2*^{-/-} hepatocytes compared to CTRL without requirement of exogenous T0901317 LXR agonist (**Figure 2D**). These data suggest that the absence of *Lect2* increases LXR activity. We hypothesize that this could be due to intracellular LXR activating ligands availability (e.g., oxysterols). To assess this hypothesis, we performed lipidomic analysis in livers from both CTRL and *Lect2*^{-/-} mice and found a selective increase in the hepatic concentration of 25-hydroxycholesterol (25-OHC), a potent activator of LXR^{35,36}, in *Lect2*^{-/-} livers compared to CTRL (**Figure 2E, S2A**).

Our findings reveal that *Lect2* impacts on lipid metabolism by regulating LXR activity at least through the hepatic accumulation of 25-OHC.

To further confirm whether *Lect2* modulates LXR activity in the liver, we performed phenotypic *Lect2* rescue experiments. To this end, *Lect2* was re-expressed through a hepato-specific adeno-associated viral vector (AAV8) (**Figure 2F**). We validated *Lect2* liver re-expression at the mRNA and protein levels, after transduction of *Lect2*-deficient mice (**Figure 2G, 2H**). Two weeks post-AAV-*Lect2* transduction, the activity of LXR in primary *Lect2*^{Rescue} hepatocytes was significantly reduced compared to *Lect2*^{-/-} hepatocytes (**Figure 2I**). At the mechanistic level, we evidenced that *Lect2* re-expression was sufficient to decrease LXR-specific target genes (*Cyp7a1*, *Abcg5*, *Abcg8*) (**Figure 2J**) and that their expression inversely correlated with *Lect2* mRNA level (**Figure 2K**). In addition, in the fasting state, we found that *Lect2* re-expression was sufficient to reduce the expression of lipogenic genes at the same level as in CTRL livers (**Figure 2L**). Collectively, these data strongly suggest that *Lect2* is involved in the control of hepatic lipogenesis through a specific targeting of the LXR pathway.

Altogether, our data demonstrate that *Lect2* mediates its effects on lipogenesis and cholesterol catabolism specifically through LXR signaling.

***Lect2* expression is increased in fatty liver mouse models and obese patients harboring fatty liver.**

As we evidenced in a physiological setting that *Lect2* was involved in the hepatic control of *de novo* lipogenesis, a feature of steatosis development, we decided to monitor its expression at the mRNA level in both diet-induced and genetically engineered NAFLD mouse models (e.g., high fat high sucrose, choline-deficient high fat diet, methionine and choline deficient high fat diet, Ob/Ob mice). We found that hepatic *Lect2* expression was significantly higher in fatty livers compared to CTRL livers (**Figure 3A**). To validate the clinical relevance of our data, we quantified the hepatic expression of *Lect2* in a well-annotated cohort of obese patients (**Table 1**). Accordingly, we found that *Lect2* was significantly upregulated in the livers of patients harboring fatty liver (NAFLD) compared to non-steatotic ones (w/o NAFLD) (**Figure 3B**). As expected, NAFLD patients displayed a higher insulin resistance index (HOMA-IR) associated with elevated blood insulin, and increased levels of circulating triglycerides (TG) and free fatty acids (FFA) compared to obese patients without

NAFLD. It is worth noting that hepatic expression of *Lect2* positively correlated with the HOMA-IR, fasting insulin, and serum TG levels (**Figure 3C**), as well as with hepatic steatosis, NAFLD activity score (NAS) and liver injury, as evaluated by the alanine aminotransferase (ALT) levels (**Figure 3D**).

Collectively, these findings establish that *Lect2* expression increases during steatosis onset and strongly suggest its implication during NAFLD progression.

Lect2 is produced by fatty hepatocytes without affecting steatosis in mice.

As we found that *Lect2* was upregulated in the liver of both NAFLD patients and several NAFLD models, we used a high fat diet (HFD) recapitulating the steatosis stage without inflammation (**Figure 4A**). As expected, *Lect2* hepatic mRNA level was significantly induced at 20 weeks of diet in CTRL mice and both CTRL and *Lect2*^{-/-} gained weight and exhibited similar liver/body weight ratios (**Figure 4A**). Insulin resistance was then evaluated using both insulin tolerance test (ITT) and oral glucose tolerance test (OGTT) and revealed no significant difference between both groups of mice (**Figure 4B, 4C**). Histological analysis of hepatic tissue showed that steatosis was similar in *Lect2*^{-/-} and CTRL livers, as shown by a homogeneous distribution of lipid droplets within liver parenchyma (**Figure 4D**). Interestingly, *Lect2* expression, as revealed using RNAscope, was strictly limited to centrilobular hepatocytes under standard diet conditions and extended to fatty hepatocytes in HFD (**Figure 4E**). Steatosis scoring revealed that there was no difference in the features of lipid droplets with an equivalent rate of macro-, medio- and micro-vesicular steatosis between the two genotypes (**Figure 4D, 4F**). We then extended the analysis to other tissular parameters such as inflammation and hepatocellular injury (including plasma level of aspartate aminotransferase) and found no significant difference between *Lect2*^{-/-} and CTRL livers (**Figure 4F, 4G**).

These data show that *Lect2* is expressed during steatosis development specifically in centrilobular and fatty hepatocytes; this may not affect neither specific features of steatosis nor glucose metabolic response.

Lect2 regulates cholesterol homeostasis and protects against mitochondrial dysfunction during NAFLD.

To better define how Lect2 is involved during steatosis, we performed RNA sequencing (RNAseq) from *Lect2*^{-/-} and CTRL livers under HFD conditions. Interestingly, GSEA revealed two main signatures significantly dysregulated in *Lect2*^{-/-} compared to CTRL livers: one related to cholesterol homeostasis and cholesterol-dependent pathways up-regulated in *Lect2*^{-/-} vs CTRL, and one linked to mitochondrial functions downregulated in *Lect2*^{-/-} vs CTRL (**Figure 5A, S3A, S3B, S3C**). Interestingly and in line with previous findings collected under standard diet, cholesterol metabolism was again affected with a significant trend towards cholesterol biosynthesis (**Figure 5B**). Moreover, we also monitored the expression levels of genes involved in cholesterol export through bile acids and found only an increase in the mRNA levels of *Cyp7a1*, *Abcb4* and *Abcb11* with no change in cholesterol export through *Abcg5* and *Abcg8* (**Figure 5C**). These findings suggest that under diet, the absence of Lect2 still induces cholesterol biosynthesis concomitantly to an increase in bile acid synthesis and export.

Surprisingly, lipidomic analyses revealed that both free and esterified cholesterol levels were significantly lower in *Lect2*^{-/-} compared to CTRL livers under HFD suggesting higher cholesterol export through bile acids in these mice (**Figure 5D, S3D**). These findings strongly suggest that Lect2 is an important player of hepatic cholesterol homeostasis.

Concomitantly to changes in cholesterol homeostasis, we found a significant downregulation of genes associated with mitochondrial functions in *Lect2*^{-/-} compared to CTRL livers under HFD, notably genes involved in electron transport, complex I biosynthesis and complex IV assembly (**Figure 5A, 5E, S3B, S3E**).

These observations prompted us to assess the respiratory capacity of primary fatty hepatocytes isolated from CTRL and *Lect2*^{-/-} mice after 4 weeks of HFD. To this end, we used a Seahorse assay and found a significant reduction in both basal and maximal respiration rates associated with a lower proton leak and ATP production-coupled respiration in *Lect2*^{-/-} compared to CTRL fatty hepatocytes (**Figure 5F, S3F**). To investigate whether these defects could be attributed to intrinsic Lect2 expression or induced by the diet, we analyzed primary hepatocytes from CTRL and *Lect2*^{-/-} mice under standard diet conditions (**Figure S3G**). Interestingly, mitochondrial

activity was comparable between the 2 genotypes, suggesting that *Lect2*'s regulatory properties are revealed under lipid overload. To determine whether these alterations were caused by fewer or defective mitochondria, we quantified genomic and mitochondrial DNA and found a similar proportion of mitochondria in both genotypes (**Figure 5G**). These data suggest that the defects observed could be due to impaired mitochondrial functions rather than mitochondrial number. Finally, as oxidative stress is a major cause of mitochondrial dysfunction during NAFLD progression, notably by impairing the electron transport chain³⁷, we investigated the antioxidant response in both CTRL and *Lect2*^{-/-} HFD livers. Interestingly, we found an increased mRNA expression of *Hmox1*, *Nqo1*, *GPX3* and *GSTM3* in *Lect2*^{-/-} compared to CTRL livers under HFD (**Figure 5H**), suggesting a possible higher accumulation of ROS in these mice.

Recent data demonstrated nuclear factor erythroid 2-related factor-1 (*Nfe2L1*) and *Nfe2L2* as guardians of cholesterol homeostasis and core components of adaptive responses to excess cellular cholesterol linked to antioxidant response^{38,39}. We first evaluated *Nfe2L1* mRNA expression, as its negative targets *Psmb1*, *Psmb2* and *Psmb5*³⁸ were downregulated in our RNA-seq analyses (**Figure S3H**), and secondly *Nfe2L2* mRNA expression. Interestingly, both genes were significantly upregulated in *Lect2*^{-/-} compared to CTRL livers under HFD (**Figure 5I**). Since *Nfe2L1* was shown to negatively regulate LXR activity³⁹ and LXR targets (e.g. *Cyp7a*, *Abcb4*, *Abcb11*) are upregulated in *Lect2*^{-/-} compared to CTRL livers under HFD, one might hypothesize that *Lect2* could be an intermediate molecular actor enabling *Nfe2L1* to exhibit its inhibitory effects on LXR.

Collectively, these findings illustrate that *Lect2* plays an important role in the balance between cholesterol biosynthesis and export through LXR pathway and suggest a role of *Lect2* in the antioxidant response and the maintenance of mitochondrial integrity under HFD.

Lect2 attenuates NASH severity by mitigating the inflammatory response and lipotoxicity in cholesterol overload diet.

To better understand, how Lect2 regulates cholesterol metabolism during NAFLD, we fed a high fat high cholesterol (HFHC) diet to CTRL and *Lect2*^{-/-} mice for 24 weeks (**Figure 6A**). First, we assessed the liver/body weight ratio and found a significant weight increase under diet without difference between the 2 genotypes. Interestingly, CTRL mice fed with HFHC exhibited the same mRNA level of *Lect2* as their standard diet counterparts (**Figure 6A**) suggesting a potential regulation in the expression of Lect2 by cholesterol sensing. Accordingly, *Lect2* RNA-scope performed on liver sections revealed a slight decrease in the staining of *Lect2* mRNA compared to HFD conditions (**Figure 6B**). We then characterized the hepatic phenotype and found no difference in the steatosis score between the 2 genotypes. However, at the histological level, inflammation and hepatocellular injuries were higher in *Lect2*^{-/-} compared to CTRL livers resulting in a higher NAS (**Figure 6B, 6C**). These findings led us to explore the fibrogenic response consecutively to the high level of inflammation occurring in *Lect2*^{-/-} compared to CTRL liver parenchyma. Interestingly, sirius red staining revealed larger collagen deposit areas in *Lect2*^{-/-} compared to CTRL livers (**Figure 6B**). Moreover, fibrosis scoring revealed a higher fibrosis grade in *Lect2*^{-/-} compared to CTRL livers under HFHC (**Figure 6C**).

To better decipher this aggravated phenotype, we performed RNAseq on livers from HFHC-fed CTRL and *Lect2*^{-/-} mice at 24 weeks. Interestingly, we evidenced once more by GSEA two main signatures significantly dysregulated in *Lect2*^{-/-} compared to control livers: one related to the inflammatory response upregulated in *Lect2*^{-/-} vs CTRL and again one linked to mitochondrial functions downregulated in *Lect2*^{-/-} vs CTRL (**Figure 6D, 6E, S4A, S4B**). Interestingly, we found an upregulation of gene sets involved in inflammatory response, notably proinflammatory and profibrogenic cytokines (*Il-1b*, *Tgfb1*) and T-cell activation signaling in *Lect2*^{-/-} livers compared to CTRL under HFD (**Figure 6E, S4C**). RT-qPCR analysis confirmed the upregulation of inflammasome-related genes (*Nlrp3*, *Caspase-1*), chemokines such as *Ccl2*, fibrosis-related genes (*Tgfb*) and *Il-6* in *Lect2*^{-/-} livers compared to CTRL under HFD (**Figure 6F**).

In view of the aggravated phenotype evidenced in *Lect2*^{-/-} livers and based on the critical contribution of lipotoxicity fueling chronic inflammation and fibrosis, we aimed to monitor potential changes in the hepatic lipid content from CTRL and *Lect2*^{-/-} livers under HFHC at 24 weeks. To this end, lipidomic analyses revealed a significant accumulation of neutral lipids (e.g., di- and triacylglycerols, 22 and 8 species respectively), involved in a variety of intracellular signaling pathways, and lipotoxic ceramides (16 species of C18 to C26) associated with a significant depletion of phosphatidylethanolamine (PE) in *Lect2*^{-/-} compared to CTRL livers (**Figure 6G**). It is noteworthy that PE and phosphatidylcholine (PC) are the most abundant phospholipids in cellular membranes, with PE being particularly enriched in mitochondrial inner membranes (~40% of total phospholipids)⁴⁰. Interestingly, the PC/PE ratio was significantly increased in *Lect2*^{-/-} compared to CTRL livers (**Figure 6H**). Of note, recent data demonstrated that even a slight decrease in mitochondrial PE content profoundly impaired mitochondrial dynamics and functions^{41,42}.

In line with these data, we again evidenced a specific RNAseq signature linked to mitochondrial electron transport chain in *Lect2*^{-/-} compared to CTRL livers (**Figure 6D, 6E**). We believe that the significant alterations in PE content evidenced in *Lect2*^{-/-} livers could be a causative event leading to mitochondrial defects and subsequently in energy production.

Collectively, these findings evidence that *Lect2* attenuates the exacerbation of inflammatory response during NASH by ensuring a balanced lipid content and proper mitochondrial functions. Our data suggest that *Lect2* could behave as a regulator of hepatic lipotoxicity during cholesterol overload.

***Lect2* is an important actor during NAFL/NASH sequence and harbors tumor suppressive functions.**

As we evidenced a drastic aggravation of the HFHC-induced NASH phenotype in absence of *Lect2*, and to definitively understand its role during NAFLD, we used the previously described choline deficient high fat diet (CD-HFD) recapitulating the whole sequence from steatosis to tumor development¹⁷ (**Figure 7A**). In agreement to previous findings, only 17% of CTRL mice developed hepatic tumors at 52 weeks of

CD-HFD (**Figure 7B**). Impressively, at the same timing, 100% of *Lect2*^{-/-} mice harbored hepatic tumors, and while CTRL mice presented 1 to 2 isolated nodules, *Lect2*^{-/-} mice displayed several (ranging from 2 to 6 nodules) multinodular hepatic tumors (**Figure 7C**). Histological analysis revealed a heterogeneous aspect of tumor features with some nodules harboring steatotic hepatocytes and/or immune infiltrates in *Lect2*^{-/-} livers associated with a higher hepatocyte proliferation rate assessed by Ki67 immunostaining (**Figure 7D, 7E**).

These results demonstrated that Lect2 through its dual immune and metabolic properties, is a critical actor during the NAFL/NASH sequence as its absence in the long term facilitates hepatic tumor development.

DISCUSSION

In mammals, the liver harbors the intrinsic ability to convert excess dietary carbohydrates into triglycerides through *de novo* lipogenesis. To adequately perform these regulations, molecular signals need to be coordinated to buffer metabolic imbalance to prevent steatosis development². Hepatic steatosis is a result of an imbalanced ratio between hepatic fatty acid supply and expenditure caused by excess peripheral lipolysis, excess fatty acid lipolysis and defective fatty acid oxidation/lipoprotein secretion. The nature of lipid species is of major importance during NAFLD progression as it is now well-admitted that lipotoxicity and inflammation are two important drivers of the disease. The main toxic lipid species identified so far are free fatty acids, diacylglycerols, phospholipids (e.g., ceramides, sphingolipids) and recent findings have revealed that cholesterol accumulation plays a major role in driving progression from steatosis to NASH^{43,44}. Indeed, cholesterol excess disrupts membrane function, causes oxidative damage, and alters organelle functions, notably mitochondria, promoting a vicious circle of inflammation and fibrosis. To avoid its detrimental effects, the liver must safely eliminate cholesterol by converting it into bile acids. In response to the damage caused by several hits during NAFLD, the liver secretes factors named hepatokines to ensure multi-organs molecular circuitries to preserve metabolic homeostasis. Recent data proposed Lect2, a multifunctional hepatic factor that we evidenced to play a major role in liver

cancer, as a novel hepatokine linked to steatosis without a thorough investigation of its metabolic effects in the liver tissue³³.

In our study, we demonstrate in standard diet conditions, that Lect2 mediates its effects on hepatic lipogenesis and cholesterol catabolism specifically through an LXR-SREBP1c-dependent signaling. Second, during HFD conditions, we evidence that Lect2 regulates cholesterol homeostasis and protects against mitochondrial dysfunction. Importantly, we find that Lect2 regulates NASH severity by mitigating both the inflammatory response and lipotoxicity in cholesterol overload diet. Finally, our data provide evidence that Lect2, through its dual immune and metabolic properties, is a critical actor during NAFL/NASH sequence and harbors tumor suppressive functions in mice as its absence in the long term facilitates hepatic tumor development. Collectively, our work highlights that Lect2 could constitute an innovative target for NAFLD treatment.

First under physiological context, one of our main findings is that Lect2 controls hepatic lipogenesis through the LXR-SREBP1c signaling pathway. At the mechanistic level, we demonstrate that Lect2 modulates LXR activity. The absence of Lect2 translated into a significant increase in LXR activity and paralleled with an enrichment in oxysterols, notably 25-OHC. Rescued Lect2 expression in liver of Lect2-deficient mice was sufficient to decrease both LXR activity and the expression of its target genes. We observed an upregulation of lipogenesis in Lect2-deficient compared to controls livers, specifically under fasting conditions with common molecular actors such as SREBP1c, FAS and ACC extensively found as downstream targets of LXR^{21,45,46}. By contrast, the expression of the glucose sensor ChREBP was not modified in the liver of Lect2-deficient mice. The effects of LXR on ChREBP are still debated. On one hand ChREBP was previously described as a direct LXR target in the liver²⁰. However, ChREBP expression is adequately induced by carbohydrates in the liver of LXR α/β -deficient mice, suggesting that LXR is dispensable for the glucose-mediated induction of ChREBP⁴⁷. We also found that the effect of Lect2 deficiency on lipogenesis was only significant under fasting conditions. Our findings are interesting since hepatic lipogenesis is normally low under fasting conditions to provide energy through fatty acid oxidation. In support of our data, LXR was evidenced as a regulator of the balance between fat oxidation and storage⁴⁸. When

refed, CTRL and *Lect2*^{-/-} mice display a physiological lipogenic process, as glucose is largely available, ensuring an adequate metabolic response to the benefit of energy storage. In line with our findings, recent data suggested that *Lect2*^{-/-} mice exhibit a higher capacity of energy expenditure in muscles compared to control mice³³. One might expect similar effects of *Lect2* on energy balance in the liver. In this scenario, *Lect2* could enable an adequate metabolic response that closely matches energetic needs.

Still under physiological context, at the molecular level, we demonstrate that *Lect2* deficiency leads to a significant increase in LXR activity associated with a selective enrichment of the LXR ligand 25-OHC. Although the LXR pathway is a central molecular node of cholesterol homeostasis²², we did not find any difference in the total amount of cholesterol in *Lect2*^{-/-} livers compared to controls, suggesting that *Lect2* could impact on 25-OHC synthesis. To explain this selective effect on 25-OHC synthesis, we hypothesize that *Lect2* could affect the expression/activity of Cholesterol 25-hydroxylase enzyme (Ch25H), thereby providing a source of 25-OHC. Interestingly, Ch25H enzyme was recently reported to be expressed under the control of LXR signaling, thus providing a source of 25-OHC in order to maintain intra-hepatic cholesterol homeostasis⁴⁹. Another possible lead could be the link between oxidative stress and 25-OHC synthesis by autoxidation⁵⁰.

The second major finding of our study is that under HFD, *Lect2* does not affect insulin resistance induced by the diet, contrary to previously published findings in which *Lect2*^{-/-} mice displayed a better insulin sensitivity under HFD (REF Lan Diabetes 2014). Moreover, we found through RNAscope labeling that *Lect2* expression is not only restricted to hepatocytes surrounding the central vein but is extended to fatty hepatocytes. We did not find any *Lect2* expression in other liver cell types. We previously reported that *Lect2*, at least in standard diet conditions, under the control of Wnt/ β -catenin signaling, is specifically expressed in the first layer of perivenous hepatocytes^{51,52}. Our observations clarify previous studies, showing other expression territories within the liver and exclude the contributions of other cell types than the hepatocytes producing *Lect2*^{30,53,54}. These discrepancies could be explained in part by the use of a different mouse model and unspecific antibodies to detect *Lect2*. Importantly, the main novel observation in our study under HFD, is that *Lect2*

regulates cholesterol biosynthesis, catabolism, and export, which ensure an efficient mitochondrial function. Indeed, we found that *Lect2* deficiency induces a shift in the balance between cholesterol biosynthesis and export, leading to an exaggerated excretion of cholesterol into bile acids. These findings are of importance as cholesterol is a fundamental actor for transduction of signals emanating from the plasma membrane. Therefore, the absence of *Lect2* under HFD might contribute to diminish hepatocyte capacity to respond and adapt to stress signals occurring under HFD. Consequently, one might hypothesize that *Lect2* ablation might worsen the liver phenotype in the long term under HFD. Moreover, we found a concomitant upregulation of *Nfe2L1*, a critical sensor of cholesterol homeostasis, and an increased expression of LXR targets in the absence of *Lect2*, both of them ensuring the elimination of cholesterol^{38,39}. Recent findings suggested that *Nfe2L1* could inhibit LXR activity although the precise mechanisms are still to be deciphered³⁸. Our findings strongly suggest a possible molecular partnership between *Nfe2L1* and *Lect2* to inhibit LXR to regulate cholesterol homeostasis. These data require further attention and are beyond the scope of the study. In line with these observations, we found an upregulation of genes involved into antioxidant response in *Lect2*^{-/-} livers compared to CTRL, suggesting a higher reactive oxygen species (ROS) accumulation. These findings were corroborated by the significant induction in the mRNA level of *Nfe2L2* regulating *Hmox1*, *Nqo1* and *Gstm3* expression. However, ROS production is an important hallmark of NAFLD progression as their accumulation leads to the mitochondrial electron transport chain defects. Indeed, we evidenced a downregulation of genes related to complexes I, III, IV and ATP-synthetase in *Lect2*-deficient compared to CTRL HFD livers. Accordingly, seahorse experiments revealed a strong diminution of basal, maximal respiration capacities with a reduction in ATP synthesis in *Lect2*^{-/-} compared to CTRL fatty hepatocytes. Quantification of mitochondrial DNA reflecting biogenesis helped to confirm that these alterations were not due to changes in mitochondria quantity but rather to intrinsic functional defects.

Our data strongly suggest that accumulated ROS in *Lect2*-deficient livers could have a negative impact on mitochondrial function by impairing the electron transport chain. We believe that *Lect2* could crosstalk with *Nfe2L1* to regulate cholesterol

homeostasis thus preventing excessive ROS accumulation to preserve mitochondrial electron transport chain integrity during NAFLD.

The third major finding of our data is that Lect2 is required to deal with cholesterol exposure. Indeed, our data reveal that the absence of Lect2 triggers an exacerbated inflammatory response causing fibrosis and lipotoxicity associated with mitochondrial dysfunction, these two features being recognized as strong drivers of NAFL/NASH progression. Our experimental design of exposure to cholesterol helped to better dissociate the metabolic and inflammatory part displayed by Lect2, as cholesterol overload restored the balance between cholesterol biosynthesis and export in Lect2-deficient livers. We expected to observe an exacerbated inflammatory response upon cholesterol exposure as we previously demonstrated that Lect2 deficiency aggravates liver cancer progression through macrophages polarization²⁹. Accordingly, we found a molecular signature of inflammation (upregulation of NLRP3 inflammasome components, *Tgfb1* and *Il-6*) and fibrosis that were increased in *Lect2*^{-/-} livers compared to CTRL under HFHC. Besides its implications in the inflammatory response, Lect2 still displays an effect on hepatocyte lipid content upon cholesterol exposure. Indeed, we found using lipidomic analysis, an accumulation of 16 species of lipotoxic ceramides (C18) in *Lect2*^{-/-} compared to CTRL livers under HFHC. It is important to note that ceramides were shown as toxic lipids during NAFLD as their accumulation can trigger inflammation, unfolded protein response (UPR), hepatocyte cell death and impair fatty acid oxidation⁵⁵. The precise mechanisms by which Lect2 prevents ceramide accumulation are still unknown. Of note ceramide accumulation could also be a cause or consequence of an exacerbated inflammatory response. Associated with ceramide excess, we also evidence changes in phospholipid contents notably a depletion of phosphatidylethanolamine (PE), the decreased level of which within the inner mitochondrial membrane has been shown to provoke profound functional disturbances⁴¹. Indeed, even a modest decrease in mitochondrial content of PE, corresponding to 30% increase in PC/PE molar ratio profoundly impaired mitochondrial dynamics and functions⁴¹. Interestingly, we evidence a downregulation of genes related to complexes I, III, IV and ATP-synthetase in our RNA-seq signature in *Lect2*^{-/-} compared to CTRL livers under HFHC. As a matter of fact, the combination of both downregulation of electron transport genes and depletion of PE possibly affecting inner mitochondrial membrane composition support

the assumption that Lect2 is essential for proper mitochondrial functions during NAFLD. In addition, one might conceive that this impaired mitochondrial phenotype is chronically aggravated by the concomitant intricately intertwined hits of inflammation and lipotoxicity. Moreover, our data demonstrate that Lect2 behaves as a regulator of the inflammatory response but also reveal that it holds dominant metabolic functions during NAFLD. Thus, studying Lect2's effects during a NASH setting is challenging as its dual effects, metabolic and immune are closely intertwined.

Finally, the main finding of our study is that Lect2 is an essential molecular actor of NAFLD as its deletion in diet-induced mouse models results in the impressive emergence of hepatic tumors. Indeed, using CD-HFD, we observed the emergence of multinodular hepatic tumors in 100% of Lect2^{-/-} mice compared to fewer nodules in only 17% of CTRL. Of note, hepatic tumors comprised heterogeneous well-differentiated proliferating nodules presenting or not steatosis and/or fibrosis.

The use of mouse models was critical to decipher the role of Lect2 in NAFLD. We evidenced an upregulation of Lect2 in different diet-induced NAFLD models, as it is also the case in NAFL/NASH patients. However, it could be seen as contradictory that a factor whose absence results in a worsened phenotype could still be induced during disease progression. The most relevant way of explaining this is to understand the upregulation of Lect2 expression as a mean to preserve the homeostasis of the liver tissue, particularly in terms of metabolic regulation and inflammation. The use of HFD in mice allowed us to discriminate the metabolic implications of Lect2 from its immunomodulatory properties, strongly suggesting that the liver requires Lect2 to face lipid overload. Indeed, inflammation is not triggered by HFD and therefore Lect2's effects are mainly focused on metabolism. We believe that this might be the role played by Lect2 in patients harboring solely steatosis. Lect2 would particularly regulate cholesterol homeostasis, ensuring an equilibrated antioxidant response that in turn protects mitochondrial integrity. These findings evidenced in mice need further testing in humans. However, discerning the role of Lect2 during NASH remains complex, especially in patients, as its second facet in the regulation of the immune response is concomitant to its metabolic properties. Several other hits (lipotoxicity, microbiota, viral infections, etc.) cooperate to sustain inflammation in the liver. We and others previously demonstrated that Lect2 polarizes macrophages and regulates

inflammation^{29,56}. Here, we also found that Lect2 prevents from the exacerbation of the inflammatory response. However, in patients, the combination of these multiple hits fueling chronic inflammation might also interfere with hepatocyte metabolism. Therefore, we could not exclude that the sustained expression of Lect2 that we evidenced in NAFLD patients could prove to be detrimental in the long term by causing tissular damage while still being required for its metabolic effects.

Altogether, our work provides the first evidence that Lect2 is a dual factor exhibiting important regulatory functions in metabolism and inflammation by modulating cholesterol homeostasis and limiting lipotoxicity and oxidative stress in hepatocytes during NAFLD. Although the quantification of Lect2 protein level in human plasma still lacks reliability, its monitoring as a biomarker could be an important indicator of NAFLD progression. Moreover, targeting Lect2 could constitute an innovative therapeutic strategy to improve metabolic disorders.

STAR METHODS

KEY RESOURCES TABLE

REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
Antibodies		
Goat HRP-conjugated α -rabbit IgG	Cell Signaling Technology	7074; RRID:AB_2099233
Horse HRP-conjugated α -mouse IgG	Cell Signaling Technology	7076; RRID:AB_330924
Mouse monoclonal α -mouse HSC70	Santa-Cruz Biotechnology	SC7298; RRID AB_627761
Rabbit polyclonal α -mouse ACC	Invitrogen	PA5-17564; RRID AB_10979444
Rabbit monoclonal α -human, mouse, rat Ki-67	Invitrogen	MA514520; RRID:AB_10979488
Rabbit polyclonal α -mouse LECT2	National Institute of Infectious Diseases, Tokyo, Japan	Dr. S Yamagoe
Bacterial and Viral Strains		
AAV8-GFP	This paper	N/A
AAV8-Lect2	This paper	N/A

pGK-TK-LXRE (x3)-Luc	Popineau et al., 2016 ⁵⁷	Popineau et al., 2016 ⁵⁷
Biological Samples		
Obese patients' liver biopsies	Department of Digestive Surgery and Liver Transplantation (Nice Hospital)	N/A
Obese patients blood samples	Department of Digestive Surgery and Liver Transplantation (Nice Hospital)	N/A
Chemicals, Peptides and Recombinant Protein		
Acetone	Carlo Erba	400971
Bovine serum albumin	Sigma-Aldrich	A8412
CaCl ₂	Sigma-Aldrich	C7902
Collagenase IV (from <i>Clostridium histolyticum</i>)	Sigma-Aldrich	C5138
Dexamethasone	Sigma-Aldrich	D2915
DMSO	Sigma-Aldrich	D8418
ECL substrate	BioRad	170-5061
EDTA	Invitrogen	15575020
EDTA-free protease inhibitors cocktail	Roche Diagnostics	11873580001
Eosin	Microm Microtech France	C036
Ethanol absolute	Carlo Erba	528131
FBS	Gibco	10270-106
Fungizone B	Gibco	15290-026
Glucose	Agilent Technologies	103577-100
Glutamine	Agilent Technologies	103579-100
Hematoxylin	Microm Microtech France	C0303
HEPES	Sigma-Aldrich	H6147
Hoechst 33342	Invitrogen	H3570
Immu-mount	Epredia	9990402
Insulin	Novo Nordisk	3400936120112
Isopropanol	Carlo Erba	415154
KCl	Sigma-Aldrich	P5405
Lipofectamine 2000	Invitrogen	11668019

NaCl	Sigma-Aldrich	S5886
Na ₂ HPO ₄	Sigma-Aldrich	S5136
Oil Red O	Sigma-Aldrich	O0625
OptiMEM 1X	Gibco	31985-062
Paraformaldehyde 4%	Carlo Erba	526936
PBS	Eurobio Scientific	CS1PBS00-01
Penicillin/streptomycin	Gibco	15140-122
Pierce BCA protein assay	Thermo Scientific	23225
Pyruvate	Agilent Technologies	103578-100
RIPA buffer	Sigma-Aldrich	R0278
SafeMount	BIO-OPTICA	05-SM250
Sirius red	Clin-Tech	640740
Sterols	Polar Lipids (Coger, Paris, France)	N/A
T0-901317	Sigma-Aldrich	T2320
Triethyl-phosphate	Sigma-Aldrich	538728
Trizol reagent	Thermo Scientific	15596018
Trypan blue	Gibco	15250-061
Turbo DNA-free	Thermo Fisher Scientific	AM1907
William's E medium, GlutaMAX supplement	Gibco	32551-020
XF DMEM pH 7,4	Agilent Technologies	103575-100
Xylene	Carlo Erba	528251
Critical Commercial Assays		
ACCU-CHEK® glucose monitor	Roche Diagnostics	07400942016
ACCU-CHECK® Test strips	Roche Diagnostics	550269868122
Cell culture microplate	Agilent Technologies	103794-100
DNeasy Blood & Tissue Kit	Qiagen	69504
High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystem	4368813
Luciferase assay system	Promega	E1500
Maxwell RSC simplyRNA Tissue Kit	Promega	AS1340

RNA 6000 Nano Kit	Agilent Technologies	5067-1511
RNAscope® H2O2 and Protease Reagents	Advanced Cell Diagnostics	322330
RNAscope® 2.5 HD Detection Reagent – BROWN	Advanced Cell Diagnostics	322310
RNAscope® Mm Lect2 Probe	Advanced Cell Diagnostics	528621
RNAscope® Negative Control Probe	Advanced Cell Diagnostics	310043
RNAscope® Positive Probe – Mm-Ppib	Advanced Cell Diagnostics	313911
RNAscope® Retrieval Agent	Advanced Cell Diagnostics	322000
RNAscope® Wash Buffer	Advanced Cell Diagnostics	310091
RNeasy Mini Kit	Qiagen	74104
Seahorse XF Cell Mito Stress Test Kit	Agilent Technologies	103015-100
SYBR Luminaris Color HiGreen qPCR Master Mix	Thermo Scientific	0383
TaqMan™ Universal Master Mix II, no UNG	Thermo Scientific	4440043
Triglycerides FS	Diasys	157609910021
Deposited Data		
Raw and analyzed microarray data	This paper	GEO:GSE
Experimental Models: Organisms/Strains		
C57BL/6J mouse	Janvier labs	N/A
Lect2-deficient (Lect2 ^{-/-}) mouse	National Institute of Infectious Diseases, Tokyo, Japan	Dr S. Yamagoe ²⁷
Ob/Ob B6.V-Lepob/J mouse	Janvier labs	N/A
Diets		
High Fat Diet	Safe	U8978 Version 19 - 260HF
High Fat High Cholesterol	Safe	E8220 Version 151 - A04 1,25% cholesterol
Choline-deficient High Fat Diet	Research Diets	D05010402i
Oligonucleotides		

Mouse-specific qPCR primers: see Supplemental Table 1	This paper	N/A
Human Lect 2	Thermo Scientific	Hs01040204_m1
Human RPLP0	Thermo Scientific	Hs99999902_m1
Mouse 18S	Thermo Scientific	Mm03928990_g1
Mouse RNR2 (16S)	Thermo Scientific	Mm04260181_s1
Mouse COX2	Thermo Scientific	Mm03294838_g1
Software and Algorithms		
GSEA Tool	Subramanian et al., 2005 ⁵⁸	https://www.gsea-msigdb.org/gsea/index.jsp
Heatmapper	Babicki et al., 2016 ⁵⁹	http://www.heatmapper.ca/expression/
Image J	National Institutes of Health	https://imagej.nih.gov/ij/ RID: SCR_003070
R	R Core Team, 2023	https://www.R-project.org/

LEAD CONTACT AND MATERIALS AVAILABILITY

Further information and requests for resources and reagents should be directed to Jean-Pierre Couty (jean-pierre.couty@inserm.fr)

EXPERIMENTAL MODEL AND SUBJECT DETAILS

Animals care and mice models

All reported animal procedures were approved by the French Institutional Animal Care and Use Committee (APAFIS #35532). Mice were colony-housed in a well-controlled animal facility, exposed to a 12h light/dark cycle with free access to tap water and control chow diet. Adult male mice from 9 to 12 weeks old were used for all fast/refed experiments. Adult male mice were switched to a high fat (Safe U8978 Version 19 - 260HF, 36% fat, Augy, France), high fat high cholesterol (Safe E8220 Version 151 - A04 1,25% cholesterol, Augy, France) or choline-deficient high fat diet (Research Diets D05010402i, New Brunswick, NJ, USA) at 6 weeks of age for respectively 20, 12 and 24, and 48 weeks. Lect2-deficient mice (Lect2^{-/-})²⁷ were

kindly provided by Dr S. Yamagoe (Japan, Tokyo) and were backcrossed for ten generations onto a C57BL/6J background. C57BL/6J lean and Ob/Ob (B6.V-Lepob/J) male mice were purchased from Janvier Laboratories (Le-Genest-St-Isle, France)

Rescue experiments

For Lect2 rescue experiments, fed Lect2^{-/-} mice received a single intravenous injection with $2,75 \times 10^{10}$ vg/mouse of an adeno-associated vector (AAV) encoding for either GFP or Lect2 under the hepato-specific transthyretin promoter (mTTR, produced by Atlantic Gene Therapies, France). Animals were sacrificed and analyzed 2 weeks later. Lect2-rescued mice are designated as Lect2^{Rescue}.

Fast and refed experiments

Fasted mice were allowed free access to tap water without chow for 24 hours prior to sacrifice. Mice designated as refed were fasted with free access to tap water for 24 hours followed by a 18h refeeding period before sacrifice with free access to chow diet and water with 20% glucose.

Insulin tolerance test

Mice were fasted for at least 4 hours prior to the experiment. Each mouse received a single intraperitoneal injection of insulin (Actrapid Penfill 100 UI/mL, Novo Nordisk 3400936120112) 0,75UI/kg. Blood glucose values were measured using an ACCU-CHEK glucose monitor and single-use strips (Roche Diagnostics 07400942016 and 550269868122).

Human studies

Thirty-seven morbidly obese patients were recruited through the Department of Digestive Surgery and Liver Transplantation (Nice Hospital, France) where they underwent bariatric surgery. This procedure was indicated for these patients in accordance with French guidelines. Exclusion criteria were hepatitis B or C infection, excessive alcohol consumption (>20g/day) or another cause of chronic liver disease as previously described⁶⁰. The characteristics of the study groups for the gene

expression are described in Table 1. Before surgery, fasting blood samples were obtained and used to measure alanine and aspartate transaminases (ALT and AST, respectively), glucose, insulin, fatty acids, cholesterol and HbA1c. Insulin resistance was calculated using the homeostatic model assessment (HOMA-IR)⁶¹. Surgical liver biopsies were obtained during the procedure and no ischemic preconditioning had been performed. Hepatic histopathological analysis was performed according to the scoring system of Kleiner et al., 2005⁹. Four histopathological features were semi-quantitatively evaluated: grade of steatosis (0, <5%; 1, 5%-30%; 2, >30%-60%; 3, >60%), lobular inflammation (0, no inflammatory foci; 1, <2 inflammatory foci per 200x field; 2, 2-4 inflammatory foci per 200x field; 3, >4 inflammatory foci per 200x field), hepatocellular ballooning (0, none; 1, few balloon cells; 2, many cells/prominent ballooning), and stage of fibrosis (from 0, none to 4, cirrhosis). All subjects gave their informed written consent to participate in this study in accordance with French legislation regarding Ethics and Human Research (Huriet-Serusclet law). The "Comité Consultatif de Protection des Personnes dans la Recherche Biomédicale de Nice" approved the study (07/04:2003, N° 03.017).

METHODS DETAILS

Primary culture of hepatocytes

Primary hepatocytes were obtained following the protocol described in Fortier et al., 2017⁶². The liver is washed in situ with 50 mL of perfusion solution containing 10 mM 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES, Sigma-Aldrich H6147), 137 mM NaCl (Sigma-Aldrich S5886), 2,68 mM KCl (Sigma-Aldrich P5405), 232 μ M Na₂HPO₄ (Sigma-Aldrich S5136), 0,5 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA, Invitrogen 15575020) dissolved in deionized sterile water. Then the liver is digested with a collagenase solution containing 0,5 mg/mL of collagenase (from *Clostridium histolyticum*, Sigma-Aldrich-Aldrich C5138) diluted in perfusion solution, and 10 mM of CaCl₂ (Sigma-Aldrich C7902). After isolation, cells were collected in complete medium: William's medium E (Gibco 32551-020) supplemented with bovine serum albumin 0,1% (Sigma-Aldrich A8412), penicillin/streptomycin 100 U/mL (Gibco 15140-122), fungizone B 100 μ g/mL (Gibco 15290-026) and dexamethasone 25 nM (Sigma-Aldrich D2915). Hepatocytes were collected by 3 rounds of washes and

centrifugation for 3 minutes each at 400 rpm and resuspended in complete medium supplemented with 10% decompemented FBS (Gibco 10270-106). Hepatocytes were counted by a trypan blue (Gibco 15250-061) exclusion method, and their viability was found to be >90%. Cells were seeded at a density of 6×10^5 cells in 60 mm dishes containing complete medium supplemented with 10% FBS and incubated at 37°C under an atmosphere containing 5% CO₂, for 4 hours, to allow the cells to adhere. The medium was then replaced with fresh serum-free complete medium.

Luciferase reporter assays

For luciferase reporter assays, the reporter construct pGK-TK-LXRE(x3)-luc was transfected with Lipofectamine 2000 (Invitrogen 11668019) for 24h according to the manufacturer's instructions. The medium was then removed and replaced with fresh serum-free complete medium containing 10 µM of LXR synthetic agonist T0-901317 (Sigma-Aldrich T2320) or DMSO (Sigma-Aldrich D8418) for 24h. Hepatocytes were then lysed, and luciferase activity was measured using the Luciferase assay system (Promega E1500). Results were normalized for transfection efficiency using a Rous sarcomavirus B-galactosidase reporter (RSV β-gal) as an internal control. Experimental data were performed in triplicate.

Seahorse analysis

Hepatocytes were plated at a density of 15 000 cells/well and in at least 5 replicates on a cell culture microplate (Agilent Technologies 103794-100) for 4 hours in complete medium supplemented with 10% FBS, then switched to complete medium for 24 hours. Hepatocytes were then washed twice with XF DMEM pH 7,4 (Agilent Technologies 103575-100) supplemented with 1 mM pyruvate (Agilent Technologies 103578-100), 2 mM glutamine (Agilent Technologies 103579-100) and 10 mM glucose (Agilent Technologies 103577-100). Mitochondrial respiration was assessed using the Seahorse XF Cell Mito Stress Test Kit (Agilent Technologies 103015-100) by the Metabolomics Core Facility at Necker Hospital (Paris, France) on an Agilent Seahorse XFe 96 Analyzer.

Western blotting

Whole liver samples or primary hepatocytes were homogenized with RIPA buffer (Sigma-Aldrich R0278) supplemented with protease and phosphatase inhibitors cocktail (Roche Diagnostics 11873580001). Protein concentration was determined using bicinchoninic acid assay (Thermo Fisher Scientific 23225). A quantity of 40 µg of proteins was resolved by SDS-PAGE and then transferred onto nitrocellulose membranes, that were incubated overnight at 4°C with primary antibodies. Appropriate horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies were used, and proteins were revealed using clarity ECL substrate (BioRad 170-5061). Results were visualized using iBright CL1500 Imaging System (Thermo Fisher).

Gene expression analysis

Human studies: Total liver RNA was extracted using the RNeasy Mini Kit (Qiagen 74104) and treated with Turbo DNA-free (Thermo Fisher Scientific AM1907) following the manufacturer's protocol. The quantity and quality of the RNA were determined using the Agilent 2100 Bioanalyzer with RNA 6000 Nano Kit (Agilent Technologies 5067-1511). Total RNA (1 µg) was reverse transcribed with a High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems 4368813). Real-time quantitative PCR was performed in duplicate for each sample using the StepOne Plus Real-Time PCR System (Thermo Fisher) as previously described⁶⁰. TaqMan gene expression assays were purchased from Thermo Fisher (RPLP0: Hs99999902_m1; Lect 2: Hs01040204_m1). Gene expression was normalized to the housekeeping gene RPLP0 (Ribosomal Phosphoprotein Large P0) and calculated based on the comparative cycle threshold Ct method ($2^{-\Delta\Delta Ct}$).

Mouse studies: Total liver RNA was extracted from frozen liver tissue or isolated hepatocytes, using Trizol (Invitrogen 15596018), according to the manufacturer's instructions. Briefly, purified RNA was then reverse-transcribed with the High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit. Real-time PCR was performed using a SYBR Luminaris Color HiGreen qPCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific K0393) on a CFX Connect Real-Time PCR Detection System (Biorad). Gene expression was normalized relative to ribosomal 18s RNA levels. Expression levels in the various

mouse liver samples were calculated for all genes, by the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method, and were compared with the level of expression of the corresponding gene in control liver tissues (expression as an n-fold ratio).

Microarray analysis

Microarray experiments and analysis were performed as previously described²⁹. All the data obtained by microarray analysis have been deposited on the Gene Expression Omnibus NCBI site under accession number GSE150230 and will be made available upon publication. Heatmap was obtained using Heatmapper online software⁵⁹.

RNAseq analysis

Total liver RNA was extracted from frozen liver tissue using the Maxwell RSC simplyRNA Tissue Kit (Promega AS1340) by following the manufacturer's instructions. Quality control and sequencing was performed by Novogene Europe (Cambridge, United Kingdom). Differential expression and gene set enrichment analysis (GSEA)⁵⁸ was performed using an in-house R script. CTRL group was used as reference, and analysis was restricted to protein-coding genes with counts ≥ 5 in at least 4 samples. The metric used for gene ranking was $\text{sign}(\log_2(\text{FoldChange})) * (-\log_{10}(\text{p-value}))$, and pathways with adjusted p-values (p-adj) $< 0,05$ were considered statistically significant.

Histological analysis

Immediately after sacrifice, liver tissues were fixed by incubation in paraformaldehyde 4% (Carlo Erba 526936) overnight at 4°C prior to embedding into paraffin wax. Hematoxylin and eosin (Microm Microtech France C0303 and C0363) and Sirius red (Clin-Tech 640740) staining was carried out on 3 mm-thick formaldehyde-fixed paraffin-embedded (FFPE) sections with a HistoCore Spectra ST Stainer (Leica Biosystems). Hematoxylin/eosin-stained and Sirius red-stained mouse tissue sections were analyzed in agreement with the most recent and accepted consensual terminology in mouse liver pathology⁶³. S.P. and C.P. were not blinded to

sample identity, J.P.C was blinded to sample identity. Tissue sections were analyzed on a Nikon Eclipse E600 brightfield upright microscope equipped with 10X/22 oculars and 4X/0.10, 10X/0.30, 20X/0.40 and 40X/0.65 plan achromatic objectives. Principal NAFLD histological features were semi-quantitatively scored based on Kleiner's grading system and adapted to mouse liver histopathology⁹. Hepatic steatosis was evaluated at low magnification, according to zonal distribution and parenchymal occupation (S0: < 5%; S1: 6-33%; S2: 34-66%; S3: >67%). Were considered only macro- and mediovesicular lipid droplets. Inflammation was evaluated by counting foci of infiltrated immune cells in 20 random, non-overlapping fields at 200X magnification and expressed as mean focus counts per 200X field before conversion to a discrete score (0-3). When counts ranged between 0.5 and 1 per 200X field, livers were given a score of 0.5. Hepatocyte ballooning being a rare feature in mice, a more general category of hepatocellular injury was defined, including hepatocyte cytoplasmic alterations, hepatocyte swelling/cytoplasm rarefaction, Mallory's hyaline bodies or cytoplasm aggregation and hepatocyte apoptosis as defined by Thoolen et al.⁶³. The minimal, mild, moderate, marked, or severe accumulation of hepatocyte injuries was converted into a discrete score (0-2). NAFLD activity score (NAS) was calculated as the unweighted sum of steatosis grade (range 0-3), lobular inflammation (range 0-3) and hepatocellular injury (range 0-2). Fibrosis was semi-quantitatively evaluated according to lobular distribution and severity as defined by the Kleiner's staging system (F0-F4)⁹. Other relevant histological features were reported as absent or present: micro-vesicular steatosis, portal inflammation, pigmented macrophages, liver foci of extramedullary hematopoiesis, hepatocyte intranuclear cytoplasmic invagination (intranuclear pseudo-inclusion), bile duct hyperplasia and oval cell hyperplasia. For each mouse, 4 to 5 liver lobes were evaluated. Representative fields were captured using a Nikon DS-Ri1 microscope camera. Oil red O staining was performed on 7 mm-thick frozen liver sections fixed in paraformaldehyde 4% for 20 minutes at room temperature. Tissue sections were washed with ice-cold PBS (Eurobio Scientific CS1PBS00-01) and incubated in Oil red O-solution (Oil red O powder 0,3% (w/v), Sigma-Aldrich O0625, triethyl-phosphate 36% (v/v), Sigma-Aldrich 538728, deionized water) for 1 hour under gentle agitation. Hematoxylin was then used to counterstain nuclei and slides were mounted using Immu-mount (Epredia 9990402). Primary hepatocytes were fixed in paraformaldehyde 4% for 20 minutes at room temperature. Hepatocytes were

washed with ice-cold PBS and incubated in Oil red O solution for 1 hour under gentle agitation. Hoechst 33342 (0,2 mg/mL, Invitrogen H3570) was used to counterstain nuclei. Images were taken using a Nikon Statif Eclipse E600 microscope with X10 and X20 magnification, 1,4 – 0,7 NA PL-APO objectives, a DMX1200 cooled CDD camera (Nikon) and ACT-1 software. Oil red O staining was quantified using the open-source software ImageJ by color segmentation in at least 10 fields at X20 magnification. Semi-quantitative analysis of Oil red O was performed on primary hepatocytes. After Oil red O staining, cells were washed with PBS then fixed Oil red O was solubilized using ice-cold isopropanol (Carlo Erba 415154) for 10 minutes under gentle agitation. Absorbance of Oil Red O was then measured at 492 nm.

Lect2 RNAscope

FFPE 5 µm liver sections were incubated 1 hour at 55°C then deparaffined with 2x5 min baths of xylene (Carlo Erba 528251), 2x1 min baths of ethanol absolute (Carlo Erba 528131) then let 5 min to dry. Endogenous peroxidases were inhibited by incubating the samples 10 min with 3 drops of RNAscope hydrogen peroxide (Advanced Cell Diagnostics 322330) then rinsing in deionized water under agitation 3x5 min. RNA was retrieved by incubating the slides 15 min at 98-102°C with 1X RNAscope retrieval agent (Advanced Cell Diagnostics 322000). Slides were cooled in ethanol absolute for 3 min then dried at room temperature, then incubated 30 min at 40°C in a HybEZ II oven (Advanced Cell Diagnostics 321720) with 3 drops of RNAscope Protease Plus (Advanced Cell Diagnostics 322330). The solution was rinsed with deionized water, excess liquid was absorbed, and slides were incubated 2 hours at 40°C with negative control (Advanced Cell Diagnostics 310043), positive (Advanced Cell Diagnostics 313911) or Lect2-specific (Advanced Cell Diagnostics 528621) probes. After incubation, slides were washed with 1X wash buffer (Advanced Cell Diagnostics 310091) 2x2 min. Amplification is an alternation of incubations and washings with Amp1-6 probes (Advanced Cell Diagnostics 322310). Probes Amp1, Amp3 and Amp5 were incubated for 30 min and probes Amp2, Amp4 and Amp6 were incubated for 15 min. Probes Amp1-Amp4 were incubated at 40°C, and Amp5 and Amp6 at room temperature. After each incubation, slides were washed with 1X wash buffer. Probe detection was carried by incubation with 120 µL of 1:1 DAB-A and DAB-B (Advanced Cell Diagnostics 322310) for 10 min at room

temperature. Slides were then washed 2x2 min with tap water, then counterstained with 1/4 hematoxylin for 2 min then rinsed with running tap water for 15 min. Dehydration was done by successive 2 min baths in ethanol 70%, ethanol 95% and 5 min in xylene, and mounting with SafeMount (BIO-OPTICA 05-SM250).

ANALYTICAL PROCEDURES

Triglyceride content

Hepatic triglycerides were extracted in acetone (Carlo Erba 400971) and TG content was measured with a colorimetric diagnostic kit according to the manufacturer's instructions (Diasys 157109910021).

Primary hepatocyte mitochondrial DNA quantification

Total DNA was extracted from a dried pellet of 6×10^5 primary hepatocytes using DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen #69504) and following the manufacturer's instructions. Samples were diluted to a final concentration of 2,5 ng/ μ L and quantitative PCR was performed on 5 ng of total DNA in 384-well plates using TaqMan™ Universal Master Mix II, no UNG (ThermoFisher Scientific #4440043) and specific TaqMan™ probes targeting nuclear 18S (REF) and mitochondrial 16S (REF) and Cox2 (REF). After 40 amplification cycles in a CFX384 Touch Real-Time PCR Detection System instrument (Bio-Rad), the ratio 16S/18S and Cox2/18S was calculated using the starting quantity calculated by the instrument.

Targeted analysis of cholesterol and oxysterols by gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS)

These experiments were performed by the Lipidomique-uBFC core facility in Dijon, France. Sterols (cholesterol-d7, 7 α -hydroxy-cholesterol-d7, 7 β -hydroxy-cholesterol-d7, 7-keto-cholesterol-d7, 25-hydroxy-cholesterol-d6, 27-hydroxy-cholesterol-d6, 24(S)-hydroxy-cholesterol) were purchased from Avanti Polar Lipids (Coger, Paris, France). Mass spectrometry quality grade solvents were purchased from Fisher Scientific (Illkirch, France). Solid phase extraction columns (Strata SI Silica, 100 mg/1 mL, 50 μ m, 70 Å) were from Phenomenex (Le Pecq, France). All

other chemicals of the highest grade available were purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). Liver homogenates (20 mg in 200 μ L of saline) were spiked with 10 μ L of an internal standard mix containing 25OH-Chol-d6 (400 ng), 27OH-Chol-d6 (400 ng), 7 α OH-chol-d7 (400 ng), 7 β OH-chol-d7 (500 ng), 7keto-chol-d7 (400 ng) and Chol-d7 (990 ng) in ethanol. Samples were hydrolyzed in argon flushed tubes with 60 μ L of potassium hydroxide 10 mol/L and 1,2 mL of ethanol for 45 min at 56°C. The resulting unesterified lipids were extracted with 5 mL of hexane and 1 mL of water. After evaporation under vacuum of the organic upper phase, lipids were solubilized in toluene (1 mL) and cholesterol and oxysterols were further purified by means of solid phase extraction on silica columns according to Dzeletovic et al., 1995⁶⁴. Each fraction was converted to trimethylsilyl ethers with 100 μ L of a mixture of bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide and trimethylchlorosilane 4/1 v/v for one hour at 80°C. After evaporation of silylating reagents under argon, extracts were finally solubilized with 100 μ L of hexane.

Sterols were analyzed by GCMS in a 7890A Gas chromatograph connected to a 5975C Mass Selective Detector (Agilent Technologies). Separation was achieved on a HP-5MS 30 m x 250 μ m column (Agilent Technologies) using helium as carrier gas (1 mL/min) and the following GC conditions: injection (1 μ L) at 250 °C using the split mode (split ratio 1:10), oven temperature program: 150 °C for one min, 15°C/min to 280°C, 1°C/min to 290°C and maintained at 290°C for 2 min. The MSD source was set up at 70 eV, 230°C.

Data were acquired in positive SIM mode using the following quantitation ions (m/z) : 456.4 for 7 α and 7 β hydroxy-cholesterol, 463,5 for 7 α and 7 β -hydroxy-cholesterol-d7, 472.4, 479.4, 145.1, 131.1, 137.1, 417.4, 423.4, 368.3 and 375.3 for 7-keto-cholesterol, 7-keto-cholesterol-d7, 24(S)-hydroxy-cholesterol, 25-hydroxy-cholesterol, 25-hydroxy-cholesterol-d6, 27-hydroxy-cholesterol, 27-hydroxy-cholesterol-d6, cholesterol and cholesterol-d7 respectively.

A calibration curve was realized for 24(S)-hydroxy-cholesterol using authentic standard (15-75 ng) and 25-hydroxy-cholesterol-d6 (400 ng) as internal standard. For each calibration point, the same method used for samples was applied. Isotope

dilution method was applied for calculations except for 24(S)-hydroxycholesterol for which linear regression was used.

Metabolomic analysis by liquid chromatography coupled with mass spectrometry (LC-MS)

Immediately after sacrifice, a liver sample from the left lobe was flash-frozen in liquid nitrogen. Metabolomic analysis was performed by the Metabolomics Core Facility at Necker Hospital (Paris, France) following the method previously described by Mackay et al., 2015. The panel is available in Supplemental table 2. Briefly, metabolites were extracted using a solution of 50% methanol, 30% acetonitrile and 20% water, whose volume was calculated from the sample weight (30 mg). Samples were then vortexed for 5 min at 4°C then centrifuged for 15 min at 16 000g at 4°C. The supernatants were collected, and liquid chromatography was performed using a SeQuant ZIC-pHilic column (Merck). Mobile phase A consisted of 20 mM ammonium carbonate plus 0,1% ammonia hydroxide in water. Mobile phase B consisted of acetonitrile. The flow rate was kept at 100 mL/min, and the gradient was 0 min, 80% of B; 30 min, 20% of B; 31 min, 80% of B; and 45 min, 80% of B. The mass spectrometer (QExactive Plus Orbitrap, Thermo Fisher Scientific) was operated in a polarity-switching mode and metabolites were identified using TraceFinder Software (Thermo Fisher Scientific). For analysis, data were normalized using auto-scale normalization. We considered p-values < 0,05 and fold changes of +/- 0,5 to be significant. Data was analyzed using an in-house R script for PCA, volcano plot and heatmap generation. Quantitative enrichment analysis was performed using the MetaboAnalyst 5.0 online tool (www.metaboanalyst.ca).

Lipidomic analysis by LC-MS/GS-MS

Lipid extraction and analysis was performed by the Foundation for Innovation in Cardiometabolism and Nutrition OMICS Core Facility (ICAN, Pitié Salpêtrière Hospital, Paris, France). For lipid extraction, 30 mg of frozen liver tissues were supplemented with methanol (final concentration 50 mg/mL) and homogenized with a Precellys Evolution (Bertin Technologies). Per sample, a volume equivalent to 1 mg of homogenized tissue (20 µL) was supplemented with an internal standard, and

lipids were extracted with 1,5 mL chloroform and 750 μ L methanol, then sonicated for 15 min. Phase separation was triggered by the addition of 450 μ L of ammonium carbonate 250 mM and sonicated for 15 min. The extracted lipids were dried and resuspended in 200 μ L of LC/ MS solvent. Phospholipids and sphingolipids were quantified by LC-ESI/MS/MS using a Prominence UFLC and a QTrap 4000 mass spectrometer. Samples (4 μ L) were injected to a Kinetex HILIC 2,6 μ m 2,1 x 150 mm column. Mobile phases consisted of water and acetonitrile containing ammonium acetate and acetic acid. Lipid species were detected using scheduled multiple reaction monitoring (sMRM) in the positive-ion mode reflecting the headgroup fragmentation of each lipid class. Neutral lipids (free and esterified cholesterol, diglycerides (DG) and triglycerides (TG) were quantified by injecting 4 μ L to an Ascentis C18 2,7 μ m 2,1 x 150 mm column. Mobile phases consisted of A (acetonitrile/water (60:40)) and B (isopropanol/acetonitrile (90:10)) in the presence of ammonium formate and formic acid. Lipid species were detected using sMRM in the positive ion mode reflecting the neutral loss of (RCOO + NH₃) for DG and TG, the product ion scan of m/z 369 (cholesterol - H₂O) for free and esterified cholesterol. An in house developed R script was used to correct for isotopic contribution on MRM signals from HILIC injections. Features with over 80% of missing values were discarded, missing values of the remaining features were imputed using the KNN approach on the MetaboAnalyst 5.0 open-source software. Lipid features whose variability exceeded 30% in the QC were removed. Raw data were expressed in 3 different ways: normalized to weight tissue (nmol/mg), normalized to total surface lipids (phospholipids, sphingolipids and free cholesterol, mol% surface lipids), normalized to total lipids (phospholipids, sphingolipids, neutral lipids, mol% total lipids).

STATISTICAL ANALYSIS

Data are expressed as means \pm SEM. Statistical significance was determined using Prism 9.0 software (GraphPad Software, San Diego, CA). For human studies, statistical significance of differential gene expression between two study groups was determined using the nonparametric Mann–Whitney test with the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ of each group. Other data from mice and cell preparations were statistically determined by two-tailed Student's t test, or one-way ANOVA followed by a post hoc analysis for

multiple group comparison. Correlations were analyzed using the Spearman rank-order correlation. We considered p values ($p < 0,05$) to be statistically significant.

DATA AND CODE AVAILABILITY

All the data obtained by microarray analysis have been deposited on the Gene Expression Omnibus NCBI site under accession number GSE 150230 and will be made available upon publication.

BIBLIOGRAPHY

1. Rui, L. (2014). Energy Metabolism in the Liver. In *Comprehensive Physiology*, R. Terjung, ed. (Wiley), pp. 177–197. 10.1002/cphy.c130024.
2. Hodson, L., and Gunn, P.J. (2019). The regulation of hepatic fatty acid synthesis and partitioning: the effect of nutritional state. *Nat Rev Endocrinol* 15, 689–700. 10.1038/s41574-019-0256-9.
3. Friedman, S.L., Neuschwander-Tetri, B.A., Rinella, M., and Sanyal, A.J. (2018). Mechanisms of NAFLD development and therapeutic strategies. *Nature Medicine* 24, 908–922. 10.1038/s41591-018-0104-9.
4. Younossi, Z., Anstee, Q.M., Marietti, M., Hardy, T., Henry, L., Eslam, M., George, J., and Bugianesi, E. (2018). Global burden of NAFLD and NASH: trends, predictions, risk factors and prevention. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 15, 11–20. 10.1038/nrgastro.2017.109.
5. Anstee, Q.M., Darlay, R., Cockell, S., Meroni, M., Govaere, O., Tiniakos, D., Burt, A.D., Bedossa, P., Palmer, J., Liu, Y.-L., et al. (2020). Genome-wide association study of non-alcoholic fatty liver and steatohepatitis in a histologically characterised cohort☆. *Journal of Hepatology* 73, 505–515. 10.1016/j.jhep.2020.04.003.
6. Lange, N.F., Radu, P., and Dufour, J.-F. (2021). Prevention of NAFLD-associated HCC: Role of lifestyle and chemoprevention. *Journal of Hepatology* 75, 1217–1227. 10.1016/j.jhep.2021.07.025.
7. Huang, D.Q., Singal, A.G., Kono, Y., Tan, D.J.H., El-Serag, H.B., and Loomba, R. (2022). Changing global epidemiology of liver cancer from 2010 to 2019: NASH is the fastest growing cause of liver cancer. *Cell Metabolism* 34, 969-977.e2. 10.1016/j.cmet.2022.05.003.
8. Brunt, E.M., and Kleiner, D.E. (2017). Challenges in the hepatic histopathology in non-alcoholic fatty liver disease. *Gut* 66, 1539–1540. 10.1136/gutjnl-2016-313379.
9. Kleiner, D.E., Brunt, E.M., Van Natta, M., Behling, C., Contos, M.J., Cummings, O.W., Ferrell, L.D., Liu, Y.-C., Torbenson, M.S., Unalp-Arida, A., et al. (2005). Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 41, 1313–1321. 10.1002/hep.20701.
10. Anstee, Q.M., Reeves, H.L., Kotsiliti, E., Govaere, O., and Heikenwalder, M. (2019). From NASH to HCC: current concepts and future challenges. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 16, 411–428. 10.1038/s41575-019-0145-7.
11. Friedman, S.L., Neuschwander-Tetri, B.A., Rinella, M., and Sanyal, A.J. (2018). Mechanisms of NAFLD development and therapeutic strategies. *Nat Med* 24, 908–922. 10.1038/s41591-018-0104-9.
12. Anstee, Q.M., Targher, G., and Day, C.P. (2013). Progression of NAFLD to diabetes mellitus, cardiovascular disease or cirrhosis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 10, 330–344. 10.1038/nrgastro.2013.41.
13. Schwabe, R.F., and Luedde, T. (2018). Apoptosis and necroptosis in the liver: a matter of life and death. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 15, 738–752. 10.1038/s41575-018-0065-y.
14. Wegermann, K., Diehl, A.M., and Moylan, C.A. (2018). Disease pathways and molecular mechanisms of nonalcoholic steatohepatitis. *Clin Liver Dis (Hoboken)* 11, 87–91. 10.1002/clid.709.

15. Gomes, A.L., Teijeiro, A., Burén, S., Tummala, K.S., Yilmaz, M., Waisman, A., Theurillat, J.-P., Perna, C., and Djouder, N. (2016). Metabolic Inflammation-Associated IL-17A Causes Non-alcoholic Steatohepatitis and Hepatocellular Carcinoma. *Cancer Cell* 30, 161–175. 10.1016/j.ccell.2016.05.020.
16. Nakagawa, H., Umemura, A., Taniguchi, K., Font-Burgada, J., Dhar, D., Ogata, H., Zhong, Z., Valasek, M.A., Seki, E., Hidalgo, J., et al. (2014). ER stress cooperates with hypernutrition to trigger TNF-dependent spontaneous HCC development. *Cancer Cell* 26, 331–343. 10.1016/j.ccr.2014.07.001.
17. Wolf, M.J., Adili, A., Piotrowitz, K., Abdullah, Z., Boege, Y., Stemmer, K., Ringelhan, M., Simonavicius, N., Egger, M., Wohlleber, D., et al. (2014). 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. 10.1016/j.ccell.2014.09.003.
18. Shimano, H., Yahagi, N., Amemiya-Kudo, M., Hasty, A.H., Osuga, J., Tamura, Y., Shionoiri, F., Iizuka, Y., Ohashi, K., Harada, K., et al. (1999). Sterol regulatory element-binding protein-1 as a key transcription factor for nutritional induction of lipogenic enzyme genes. *J. Biol. Chem.* 274, 35832–35839. 10.1074/jbc.274.50.35832.
19. Iizuka, K., Bruick, R.K., Liang, G., Horton, J.D., and Uyeda, K. (2004). Deficiency of carbohydrate response element-binding protein (ChREBP) reduces lipogenesis as well as glycolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 7281–7286. 10.1073/pnas.0401516101.
20. Cha, J.-Y., and Repa, J.J. (2007). The liver X receptor (LXR) and hepatic lipogenesis. The carbohydrate-response element-binding protein is a target gene of LXR. *J. Biol. Chem.* 282, 743–751. 10.1074/jbc.M605023200.
21. Repa, J.J., Liang, G., Ou, J., Bashmakov, Y., Lobaccaro, J.M., Shimomura, I., Shan, B., Brown, M.S., Goldstein, J.L., and Mangelsdorf, D.J. (2000). Regulation of mouse sterol regulatory element-binding protein-1c gene (SREBP-1c) by oxysterol receptors, LXRalpha and LXRbeta. *Genes Dev.* 14, 2819–2830. 10.1101/gad.844900.
22. Peet, D.J., Turley, S.D., Ma, W., Janowski, B.A., Lobaccaro, J.M., Hammer, R.E., and Mangelsdorf, D.J. (1998). Cholesterol and bile acid metabolism are impaired in mice lacking the nuclear oxysterol receptor LXR alpha. *Cell* 93, 693–704. 10.1016/s0092-8674(00)81432-4.
23. Brown, M.S., and Goldstein, J.L. (2009). Cholesterol feedback: from Schoenheimer's bottle to Scap's MELADL. *Journal of Lipid Research* 50, S15–S27. 10.1194/jlr.R800054-JLR200.
24. King, R.J., Singh, P.K., and Mehla, K. (2022). The cholesterol pathway: impact on immunity and cancer. *Trends in Immunology* 43, 78–92. 10.1016/j.it.2021.11.007.
25. Stefan, N., Schick, F., Birkenfeld, A.L., Häring, H.-U., and White, M.F. (2023). The role of hepatokines in NAFLD. *Cell Metabolism*, 236–252.
26. Yamagoe, S., Mizuno, S., and Suzuki, K. (1998). Molecular cloning of human and bovine LECT2 having a neutrophil chemotactic activity and its specific expression in the liver. *Biochim. Biophys. Acta* 1396, 105–113. 10.1016/s0167-4781(97)00181-4.
27. Saito, T., Okumura, A., Watanabe, H., Asano, M., Ishida-Okawara, A., Sakagami, J., Sudo, K., Hatano-Yokoe, Y., Bezbradica, J.S., Joyce, S., et al. (2004). Increase in hepatic NKT cells in leukocyte cell-derived chemotaxin 2-

- deficient mice contributes to severe concanavalin A-induced hepatitis. *J. Immunol.* **173**, 579–585. 10.4049/jimmunol.173.1.579.
28. Anson, M., Crain-Denoyelle, A.-M., Baud, V., Chereau, F., Gougelet, A., Terris, B., Yamagoe, S., Colnot, S., Viguier, M., Perret, C., et al. (2012). Oncogenic β -catenin triggers an inflammatory response that determines the aggressiveness of hepatocellular carcinoma in mice. *J. Clin. Invest.* **122**, 586–599. 10.1172/JCI43937.
 29. L'Hermitte, A., Pham, S., Cadoux, M., Couchy, G., Caruso, S., Anson, M., Crain-Denoyelle, A.-M., Celton-Morizur, S., Yamagoe, S., Zucman-Rossi, J., et al. (2019). Lect2 Controls Inflammatory Monocytes to Constrain the Growth and Progression of Hepatocellular Carcinoma. *Hepatology* **69**, 160–178. 10.1002/hep.30140.
 30. Xu, M., Xu, H.-H., Lin, Y., Sun, X., Wang, L.-J., Fang, Z.-P., Su, X.-H., Liang, X.-J., Hu, Y., Liu, Z.-M., et al. (2019). LECT2, a Ligand for Tie1, Plays a Crucial Role in Liver Fibrogenesis. *Cell* **178**, 1478-1492.e20. 10.1016/j.cell.2019.07.021.
 31. Lin, Y., Dong, M.-Q., Liu, Z.-M., Xu, M., Huang, Z.-H., Liu, H.-J., Gao, Y., and Zhou, W.-J. (2022). A strategy of vascular-targeted therapy for liver fibrosis. *Hepatology* **76**, 660–675. 10.1002/hep.32299.
 32. Shirasaki, T., Yamagoe, S., Shimakami, T., Murai, K., Imamura, R., Ishii, K.-A., Takayama, H., Matsumoto, Y., Tajima-Shirasaki, N., Nagata, N., et al. (2022). Leukocyte cell-derived chemotaxin 2 is an antiviral regulator acting through the proto-oncogene MET. *Nat Commun* **13**, 3176. 10.1038/s41467-022-30879-3.
 33. Lan, F., Misu, H., Chikamoto, K., Takayama, H., Kikuchi, A., Mohri, K., Takata, N., Hayashi, H., Matsuzawa-Nagata, N., Takeshita, Y., et al. (2014). LECT2 functions as a hepatokine that links obesity to skeletal muscle insulin resistance. *Diabetes* **63**, 1649–1664. 10.2337/db13-0728.
 34. Okumura, A., Unoki-Kubota, H., Matsushita, Y., Shiga, T., Moriyoshi, Y., Yamagoe, S., and Kaburagi, Y. (2013). Increased serum leukocyte cell-derived chemotaxin 2 (LECT2) levels in obesity and fatty liver. *Biosci Trends* **7**, 276–283.
 35. Chen, W., Chen, G., Head, D.L., Mangelsdorf, D.J., and Russell, D.W. (2007). Enzymatic reduction of oxysterols impairs LXR signaling in cultured cells and the livers of mice. *Cell Metab.* **5**, 73–79. 10.1016/j.cmet.2006.11.012.
 36. Janowski, B.A., Willy, P.J., Devi, T.R., Falck, J.R., and Mangelsdorf, D.J. (1996). An oxysterol signalling pathway mediated by the nuclear receptor LXR alpha. *Nature* **383**, 728–731. 10.1038/383728a0.
 37. Nassir, F., and Ibdah, J. (2014). Role of Mitochondria in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *IJMS* **15**, 8713–8742. 10.3390/ijms15058713.
 38. Widenmaier, S.B., Snyder, N.A., Nguyen, T.B., Arduini, A., Lee, G.Y., Arruda, A.P., Saksi, J., Bartelt, A., and Hotamisligil, G.S. (2017). NRF1 Is an ER Membrane Sensor that Is Central to Cholesterol Homeostasis. *Cell* **171**, 1094-1109.e15. 10.1016/j.cell.2017.10.003.
 39. Akl, M.G., Li, L., Baccetto, R., Phanse, S., Zhang, Q., Trites, M.J., McDonald, S., Aoki, H., Babu, M., and Widenmaier, S.B. (2023). Complementary gene regulation by NRF1 and NRF2 protects against hepatic cholesterol overload. *Cell Reports* **42**, 112399. 10.1016/j.celrep.2023.112399.
 40. Van Der Veen, J.N., Kennelly, J.P., Wan, S., Vance, J.E., Vance, D.E., and Jacobs, R.L. (2017). The critical role of phosphatidylcholine and

- phosphatidylethanolamine metabolism in health and disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1859, 1558–1572. 10.1016/j.bbamem.2017.04.006.
41. Tasseva, G., Bai, H.D., Davidescu, M., Haromy, A., Michelakis, E., and Vance, J.E. (2013). Phosphatidylethanolamine Deficiency in Mammalian Mitochondria Impairs Oxidative Phosphorylation and Alters Mitochondrial Morphology. *Journal of Biological Chemistry* 288, 4158–4173. 10.1074/jbc.M112.434183.
 42. Van Der Veen, J.N., Lingrell, S., Da Silva, R.P., Jacobs, R.L., and Vance, D.E. (2014). The Concentration of Phosphatidylethanolamine in Mitochondria Can Modulate ATP Production and Glucose Metabolism in Mice. *Diabetes* 63, 2620–2630. 10.2337/db13-0993.
 43. Ioannou, G.N. (2016). The Role of Cholesterol in the Pathogenesis of NASH. *Trends in Endocrinology & Metabolism* 27, 84–95. 10.1016/j.tem.2015.11.008.
 44. Wang, X., Cai, B., Yang, X., Sonubi, O.O., Zheng, Z., Ramakrishnan, R., Shi, H., Valenti, L., Pajvani, U.B., Sandhu, J., et al. (2020). Cholesterol Stabilizes TAZ in Hepatocytes to Promote Experimental Non-alcoholic Steatohepatitis. *Cell Metabolism* 31, 969-986.e7. 10.1016/j.cmet.2020.03.010.
 45. Joseph, S.B., Laffitte, B.A., Patel, P.H., Watson, M.A., Matsukuma, K.E., Walczak, R., Collins, J.L., Osborne, T.F., and Tontonoz, P. (2002). Direct and indirect mechanisms for regulation of fatty acid synthase gene expression by liver X receptors. *J. Biol. Chem.* 277, 11019–11025. 10.1074/jbc.M111041200.
 46. Talukdar, S., and Hillgartner, F.B. (2006). The mechanism mediating the activation of acetyl-coenzyme A carboxylase- α gene transcription by the liver X receptor agonist T0-901317. *J. Lipid Res.* 47, 2451–2461. 10.1194/jlr.M600276-JLR200.
 47. Denechaud, P.-D., Bossard, P., Lobaccaro, J.-M.A., Millatt, L., Staels, B., Girard, J., and Postic, C. (2008). ChREBP, but not LXRs, is required for the induction of glucose-regulated genes in mouse liver. *J. Clin. Invest.* 118, 956–964. 10.1172/JCI34314.
 48. Kalaany, N.Y., Gauthier, K.C., Zavacki, A.M., Mammen, P.P.A., Kitazume, T., Peterson, J.A., Horton, J.D., Garry, D.J., Bianco, A.C., and Mangelsdorf, D.J. (2005). LXRs regulate the balance between fat storage and oxidation. *Cell Metab.* 1, 231–244. 10.1016/j.cmet.2005.03.001.
 49. Liu, Y., Wei, Z., Ma, X., Yang, X., Chen, Y., Sun, L., Ma, C., Miao, Q.R., Hajjar, D.P., Han, J., et al. (2018). 25-Hydroxycholesterol activates the expression of cholesterol 25-hydroxylase in an LXR-dependent mechanism. *J. Lipid Res.* 59, 439–451. 10.1194/jlr.M080440.
 50. Kloudova, A., Guengerich, F.P., and Soucek, P. (2017). The Role of Oxysterols in Human Cancer. *Trends Endocrinol. Metab.* 28, 485–496. 10.1016/j.tem.2017.03.002.
 51. Ovejero, C., Cavard, C., Périanin, A., Hakvoort, T., Vermeulen, J., Godard, C., Fabre, M., Chafey, P., Suzuki, K., Romagnolo, B., et al. (2004). Identification of the leukocyte cell-derived chemotaxin 2 as a direct target gene of β -catenin in the liver. *Hepatology* 40, 167–176. 10.1002/hep.20286.
 52. Benhamouche, S., Decaens, T., Godard, C., Chambrey, R., Rickman, D.S., Moinard, C., Vasseur-Cognet, M., Kuo, C.J., Kahn, A., Perret, C., et al. (2006). Apc Tumor Suppressor Gene Is the “Zonation-Keeper” of Mouse Liver. *Developmental Cell* 10, 759–770. 10.1016/j.devcel.2006.03.015.
 53. Li, X., Lin, P., Tao, Y., Jiang, X., Li, T., Wang, Y., Wang, C., and Cao, Y. (2021). LECT 2 Antagonizes FOXM1 Signaling via Inhibiting MET to Retard

- PDAC Progression. *Front. Cell Dev. Biol.* 9, 661122. 10.3389/fcell.2021.661122.
54. Gao, Y., Fan, S., Zhao, P., Li, H., Cai, C., Li, X., Zhou, Y., Huang, M., and Bi, H. (2023). β -catenin/TCF4 inhibitors ICG-001 and LF3 alleviate BDL-induced liver fibrosis by suppressing LECT2 signaling. *Chemico-Biological Interactions* 371, 110350. 10.1016/j.cbi.2023.110350.
 55. Hajduch, E., Lachkar, F., Ferré, P., and Foufelle, F. (2021). Roles of Ceramides in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *JCM* 10, 792. 10.3390/jcm10040792.
 56. Lu, X.-J., Chen, J., Yu, C.-H., Shi, Y.-H., He, Y.-Q., Zhang, R.-C., Huang, Z.-A., Lv, J.-N., Zhang, S., and Xu, L. (2013). LECT2 protects mice against bacterial sepsis by activating macrophages via the CD209a receptor. *Journal of Experimental Medicine* 210, 5–13. 10.1084/jem.20121466.
 57. Popineau, L., Morzyglod, L., Carré, N., Caüzac, M., Bossard, P., Prip-Buus, C., Lenoir, V., Ragazzon, B., Fauveau, V., Robert, L., et al. (2016). Novel Grb14-Mediated Cross Talk between Insulin and p62/Nrf2 Pathways Regulates Liver Lipogenesis and Selective Insulin Resistance. *Mol. Cell. Biol.* 36, 2168–2181. 10.1128/MCB.00170-16.
 58. Subramanian, A., Tamayo, P., Mootha, V.K., Mukherjee, S., Ebert, B.L., Gillette, M.A., Paulovich, A., Pomeroy, S.L., Golub, T.R., Lander, E.S., et al. (2005). Gene set enrichment analysis: A knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 15545–15550. 10.1073/pnas.0506580102.
 59. Babicki, S., Arndt, D., Marcu, A., Liang, Y., Grant, J.R., Maciejewski, A., and Wishart, D.S. (2016). Heatmapper: web-enabled heat mapping for all. *Nucleic Acids Res* 44, W147–W153. 10.1093/nar/gkw419.
 60. Patouraux, S., Rousseau, D., Bonnafous, S., Lebeaupin, C., Luci, C., Canivet, C.M., Schneck, A.-S., Bertola, A., Saint-Paul, M.-C., Iannelli, A., et al. (2017). CD44 is a key player in non-alcoholic steatohepatitis. *Journal of Hepatology* 67, 328–338. 10.1016/j.jhep.2017.03.003.
 61. Wallace, T.M., Levy, J.C., and Matthews, D.R. (2004). Use and Abuse of HOMA Modeling. *Diabetes Care* 27, 1487–1495. 10.2337/diacare.27.6.1487.
 62. Fortier, M., Celton-Morizur, S., and Desdouets, C. (2017). Incomplete cytokinesis/binucleation in mammals: the powerful system of hepatocytes. *Methods in Cell Biology*, 119–142.
 63. Thoolen, B., Maronpot, R.R., Harada, T., Nyska, A., Rousseaux, C., Nolte, T., Malarkey, D.E., Kaufmann, W., Küttler, K., Deschl, U., et al. (2010). Proliferative and Nonproliferative Lesions of the Rat and Mouse Hepatobiliary System. *Toxicol Pathol* 38, 5S-81S. 10.1177/0192623310386499.
 64. Dzeletovic, S., Breuer, O., Lund, E., and Diczfalusy, U. (1995). Determination of cholesterol oxidation products in human plasma by isotope dilution-mass spectrometry. *Analytical biochemistry*, 73–80.

FOOTNOTES

Contributors: SP and CP designed, performed, and analyzed the experiments, compiled the data with statistical analysis, designed the figures and wrote the manuscript. JGA, PM, and IGA performed the experiments. PC provided critical help on RNAseq workflow and analysis. FB designed experiments and compiled the data. AL analyzed the experiments, compiled the data with statistical analysis. IN performed metabolomics and seahorse experiments. ML performed lipidomic experiments, analyzed and compiled the data. SB performed human studies. JJP performed experiments to create the AAV8 constructs. SC designed AAV8 constructs and analyzed the data. MC performed *in vivo* experiments. JPPB performed lipidomic analyses and compiled the data. SCM and SY analyzed the data and provided critical help on the writing of the manuscript. AT provided the cohort of obese patients and clinical data. PG analyzed the experiments, provided critical issues on the studies, writing of the manuscript, and funded human studies. CP* designed, analyzed the experiments, and provided critical help on the writing of the manuscript. CD provided critical help on the manuscript and experimental strategies. CP** and JPC designed, performed, analyzed the experiments, funded the project, and wrote the manuscript.

Fundings: This study was supported by grants from the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), Fondation Recherche Médicale (**FRM**) **Equipe labellisée EQU201903007824**, the Institut National du Cancer (PRTK-2017, PLBIO 2018-140), Fondation ARC (Association de Recherche sur le Cancer, PJA20171206232), Ligue Contre le Cancer (Comité de Paris, RS18/75-105), The Association Française pour l'Etude du Foie (AFEF-SUBV 2019), EVA-Plan Cancer INSERM HTE (CD16084DS) and the Agence Nationale de Recherche ANR-METALEC (ANR-19-CE14). This work was also supported The Association Française pour l'Etude du Foie (AFEF) and by the French Government (National Research Agency, ANR): #ANR-18-CE14-0019-02, ANR-19-CE14-0044-01 and through the "Investments for the Future" LABEX SIGNALIFE (#ANR-11-LABX-0028-01) and the UCA^{JEDI} Investments in the Future project (#ANR-15-IDEX-01) to PG.

SP was a fellow of Ecole Pratique des Hautes Etudes (EPHE) and received a fellowship from Paris Sciences et Lettres (PSL) Research University (3 years) and a fellowship from AFEF (6 months). SP received an award in 2018 on this project at the European meeting Génomique Fonctionnelle du Foie (GFF).

CP was a fellow of Université Paris Cité and received a fellowship from the same institution (3,5 years) and Foundation ARC (6 months).

Competing interests: None declared.

Ethics approval: The study was approved by the Institutional Review Board committees.

Patient consent for publication: Obtained.

TABLE 1.

	Without NAFLD	With NAFLD	p-value
n	7	30	
Age (years)	35.29 ± 5.08	39.03 ± 1.91	0.417
Sex (F/M)	6/1	20/10	0.648
BMI (kg/m ²)	43.07 ± 0.41	44.11 ± 0.95	0.751
ALT (IU/L)	14.71 ± 1.44	55.33 ± 10.25	< 0.001
Insulin (mIU/L)	10.57 ± 2.65	25.02 ± 4.14	0.040
Glucose (mmol/L)	4.87 ± 0.10	6.24 ± 0.54	0.009
HOMA-IR	2.22 ± 0.49	7.48 ± 1.53	0.020
HbA1c (%)	5.30 ± 0.16	6.11 ± 0.23	0.013
Triglycerides (mmol/L)	0.93 ± 0.12	2.36 ± 0.38	0.002
Cholesterol (mmol/L)	4.76 ± 0.35	5.62 ± 0.20	0.057
FFA (mmol/L)	0.46 ± 0.05	0.66 ± 0.04	0.036
NAFLD activity score (n)	0 (7)	2 (7) / 3 (11) / 5 (12)	
Steatosis grade (n)	0 (7)	2 (8) / 3 (22)	
Lobular inflamantion (n)	0 (7)	0 (18) / 1 (12)	
Hepatocellular ballooning (n)	0 (7)	0 (17) / 1 (13)	

Figure 1.

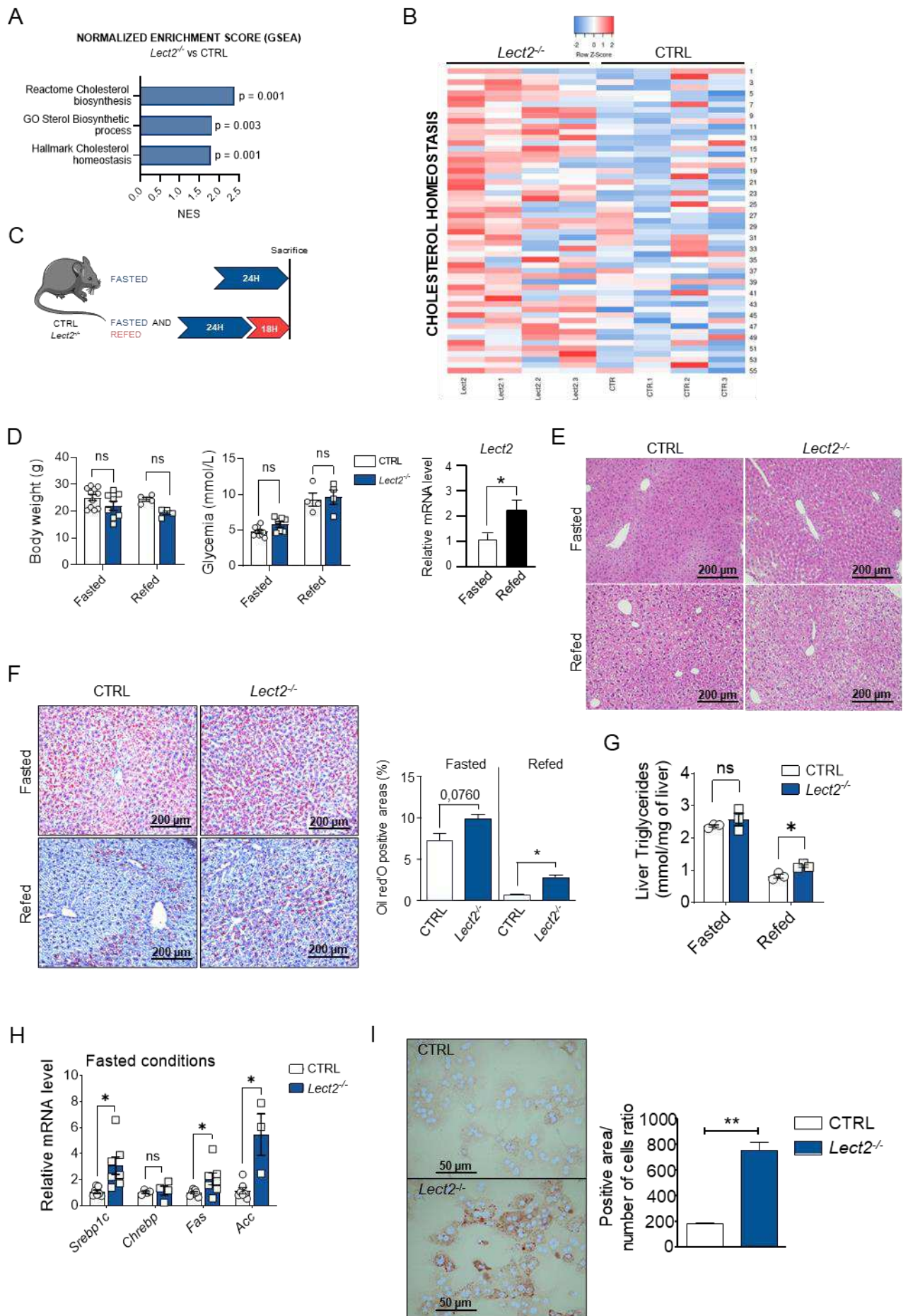


Figure 2.

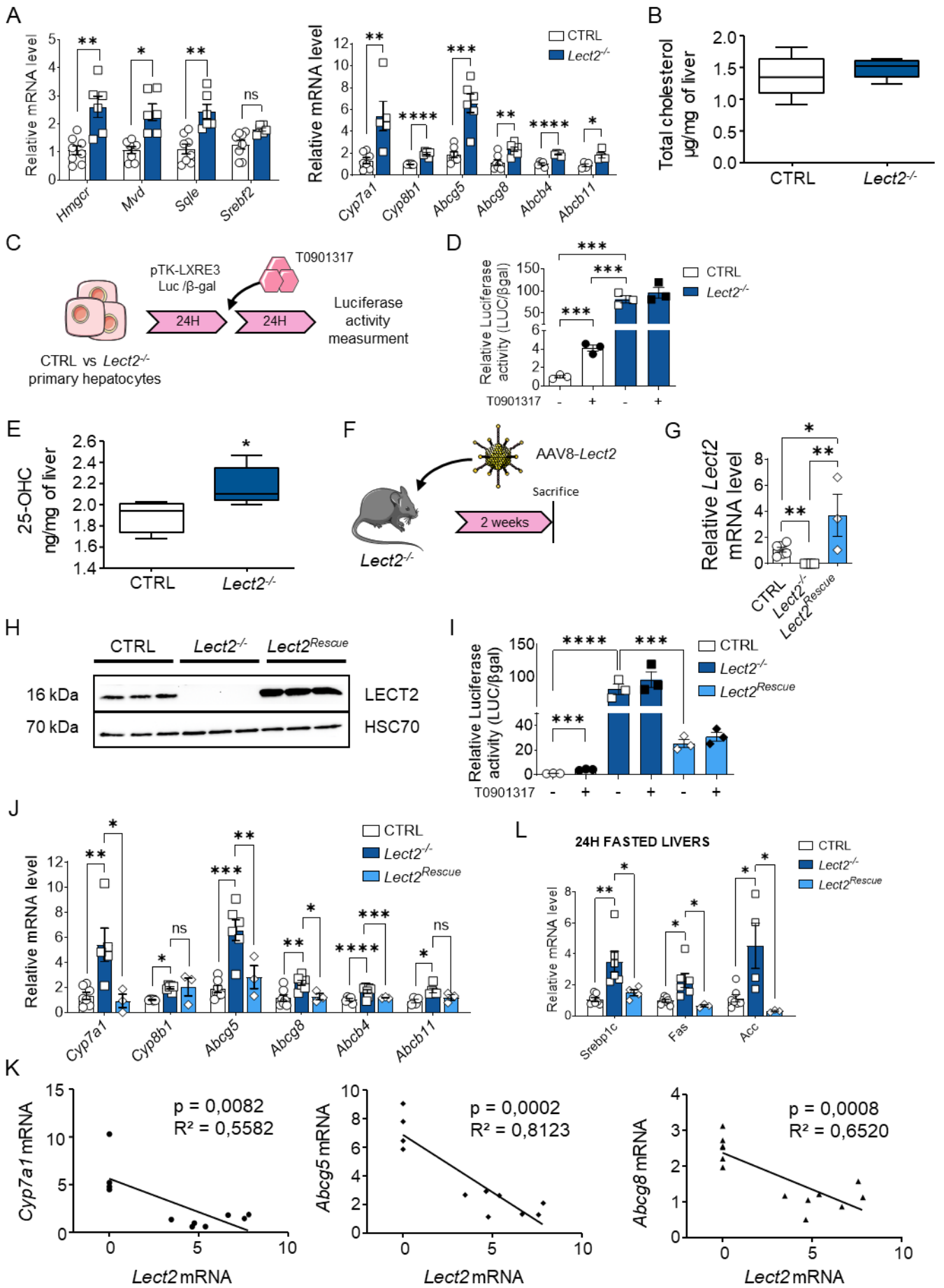


Figure 3.

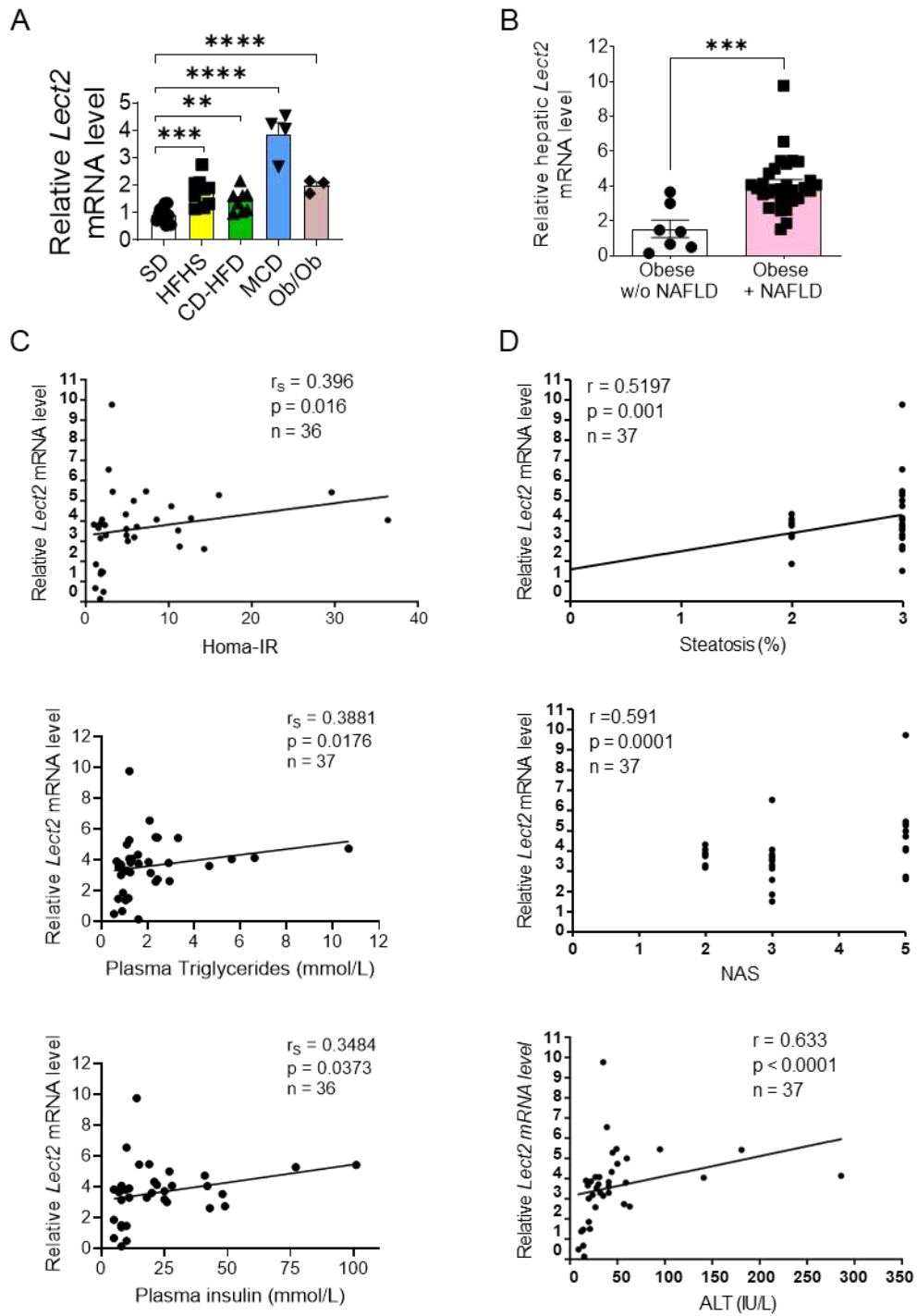


Figure 4.

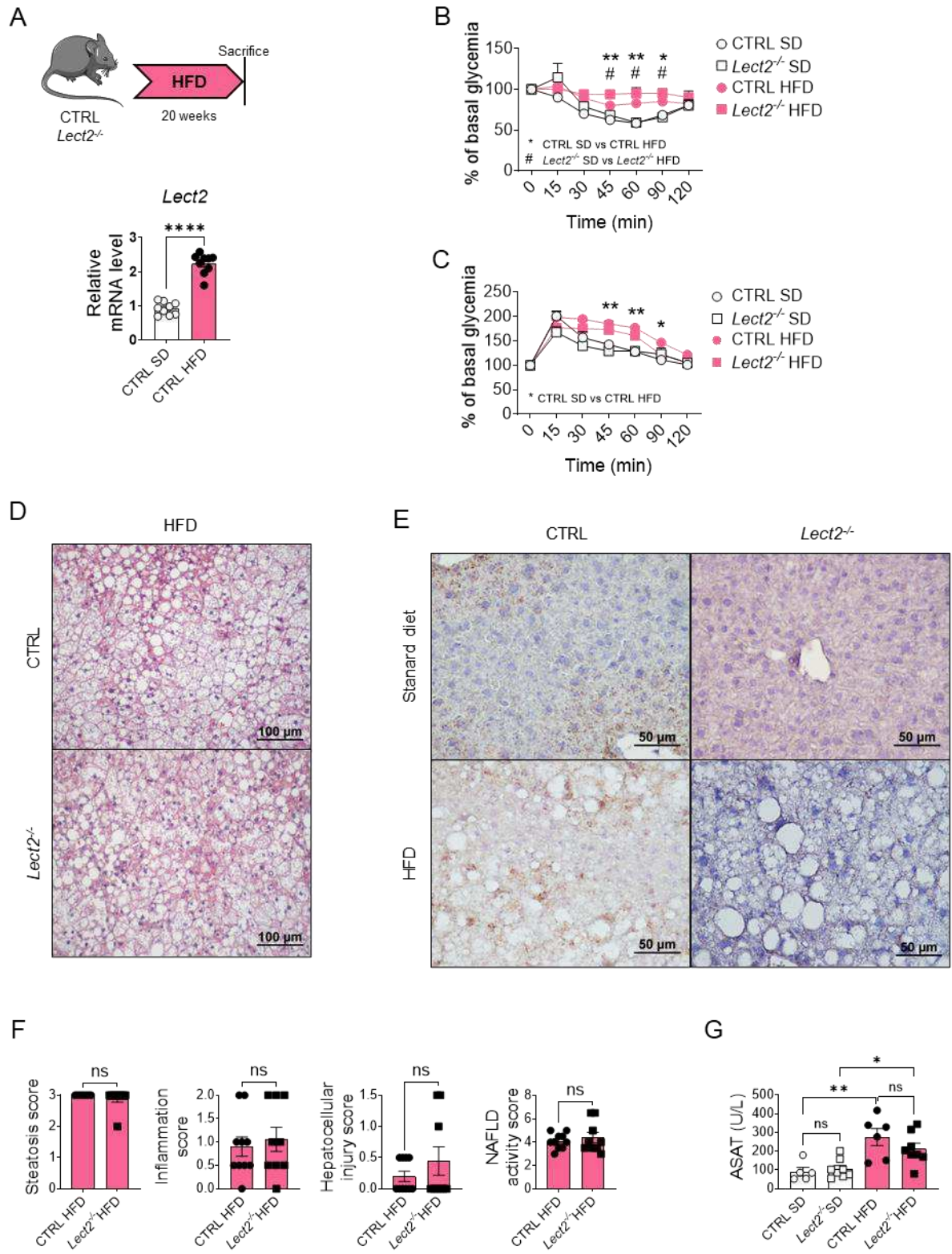


Figure 5.

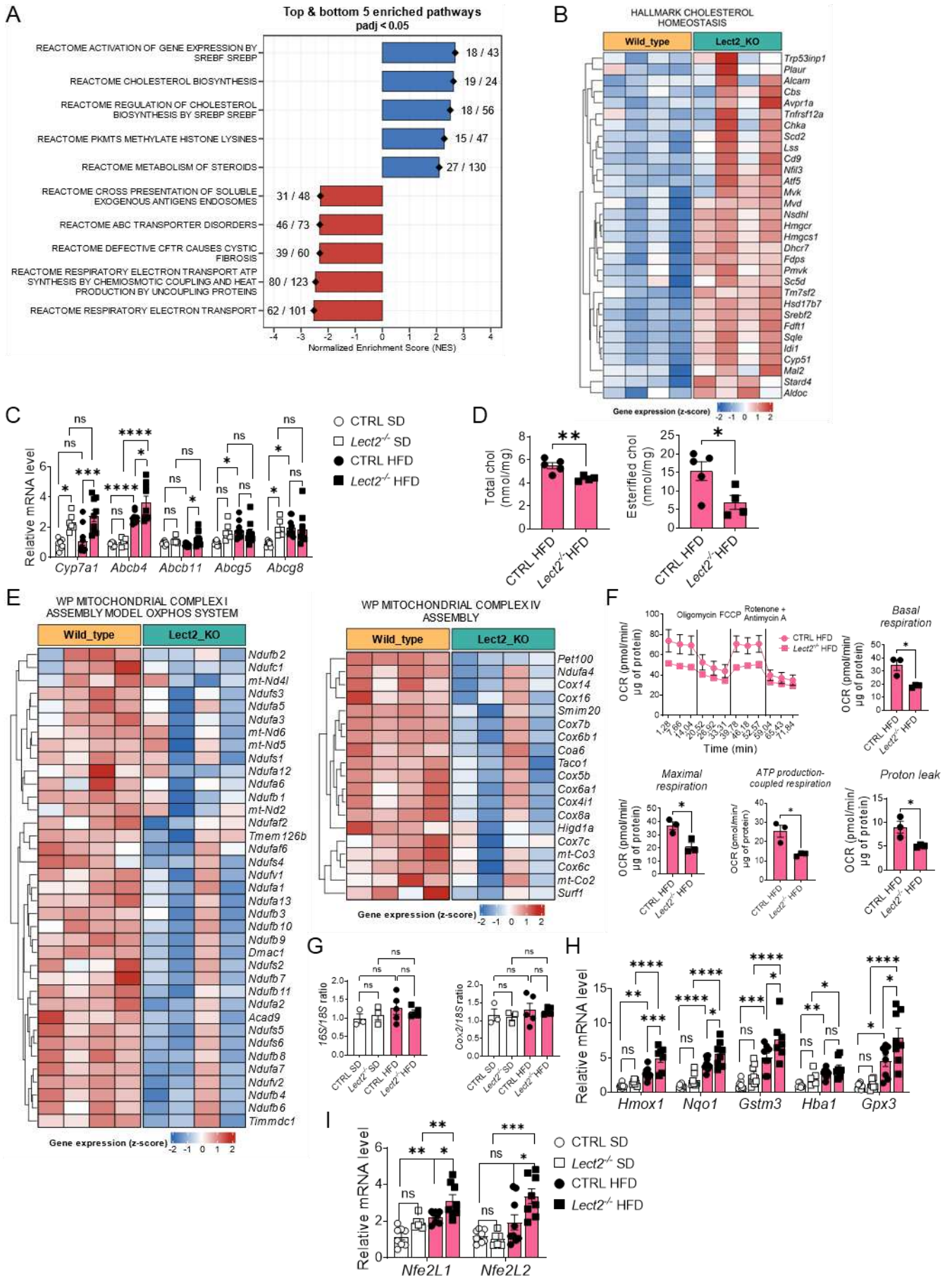


Figure 6.

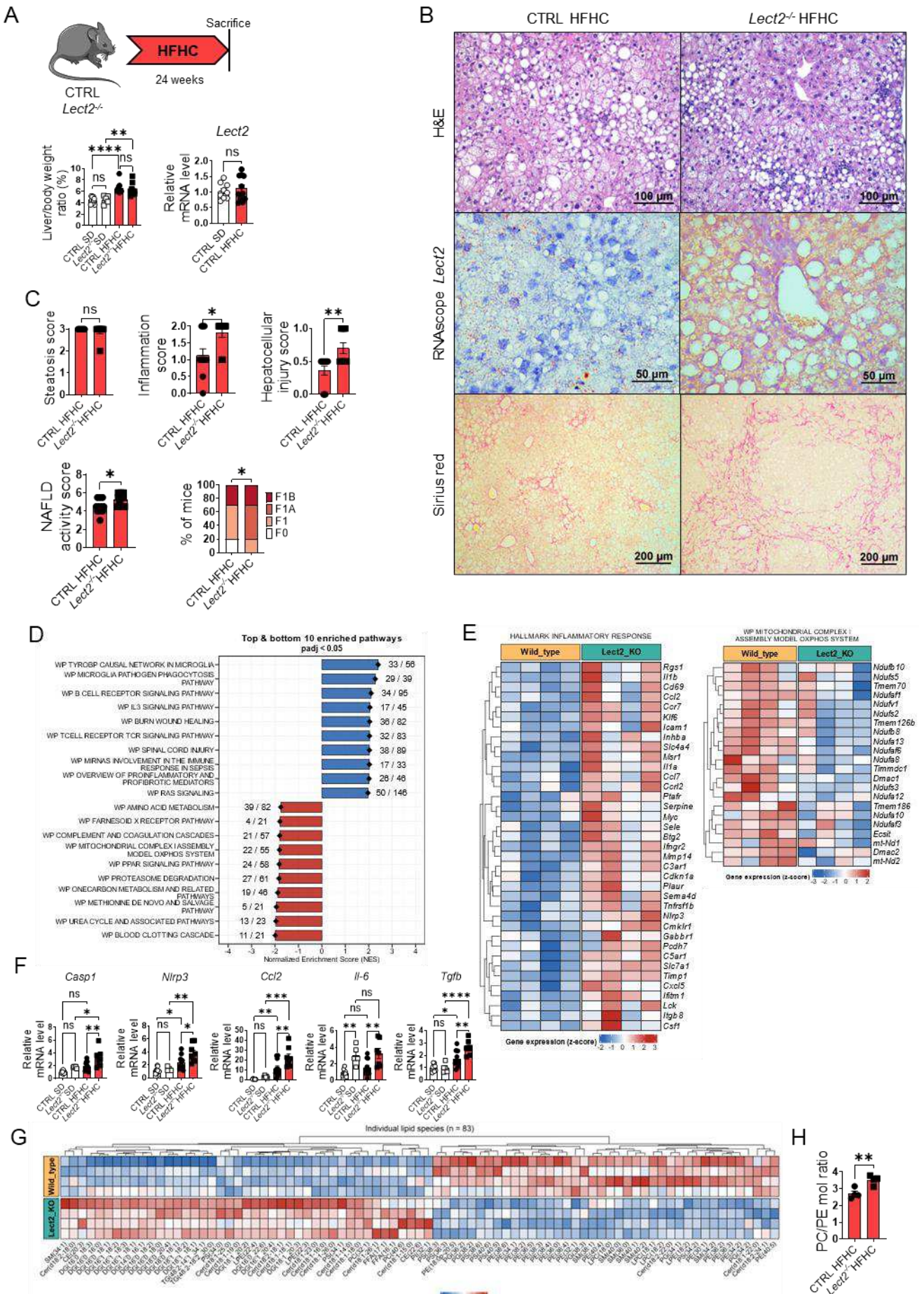


Figure 7

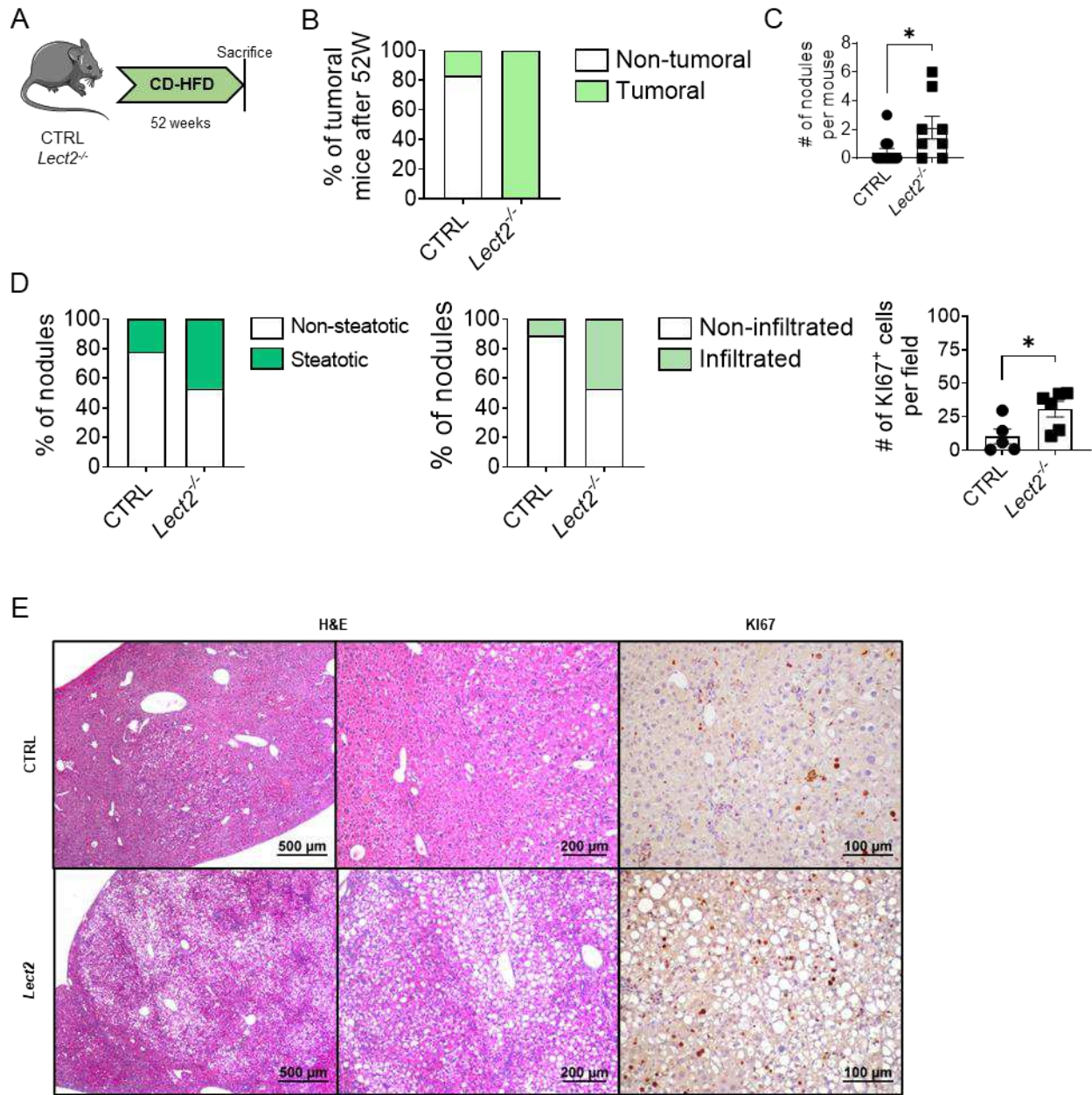
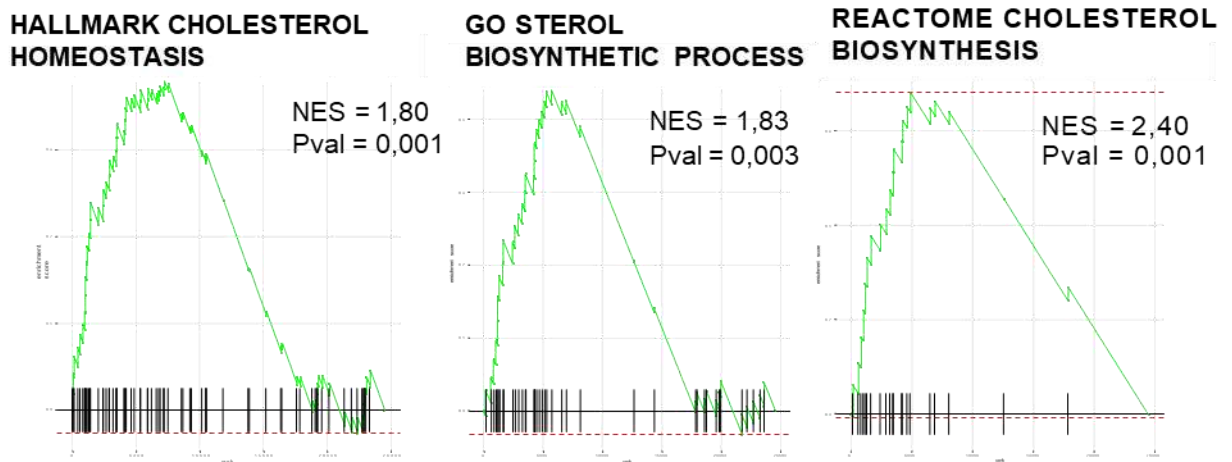
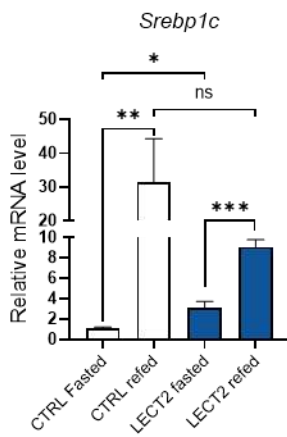


Figure S1. Related to Figure 1

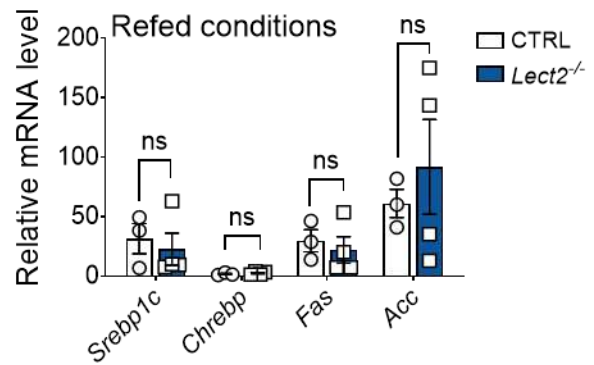
A



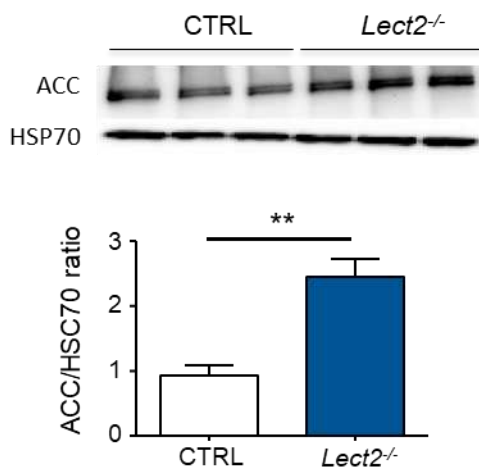
B



C



D



E

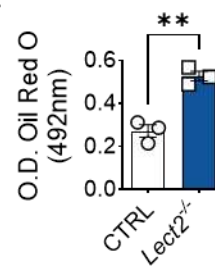


Figure S2. Related to Figure 2.

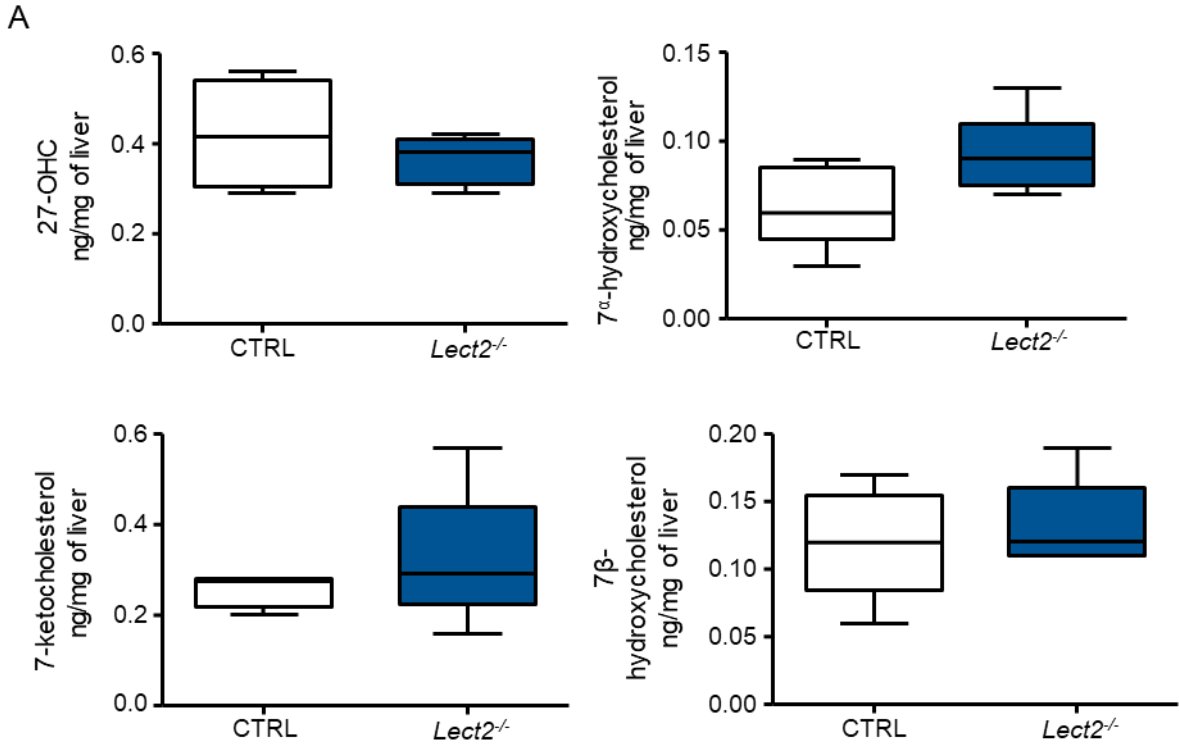


Figure S3. Related to Figure 5.

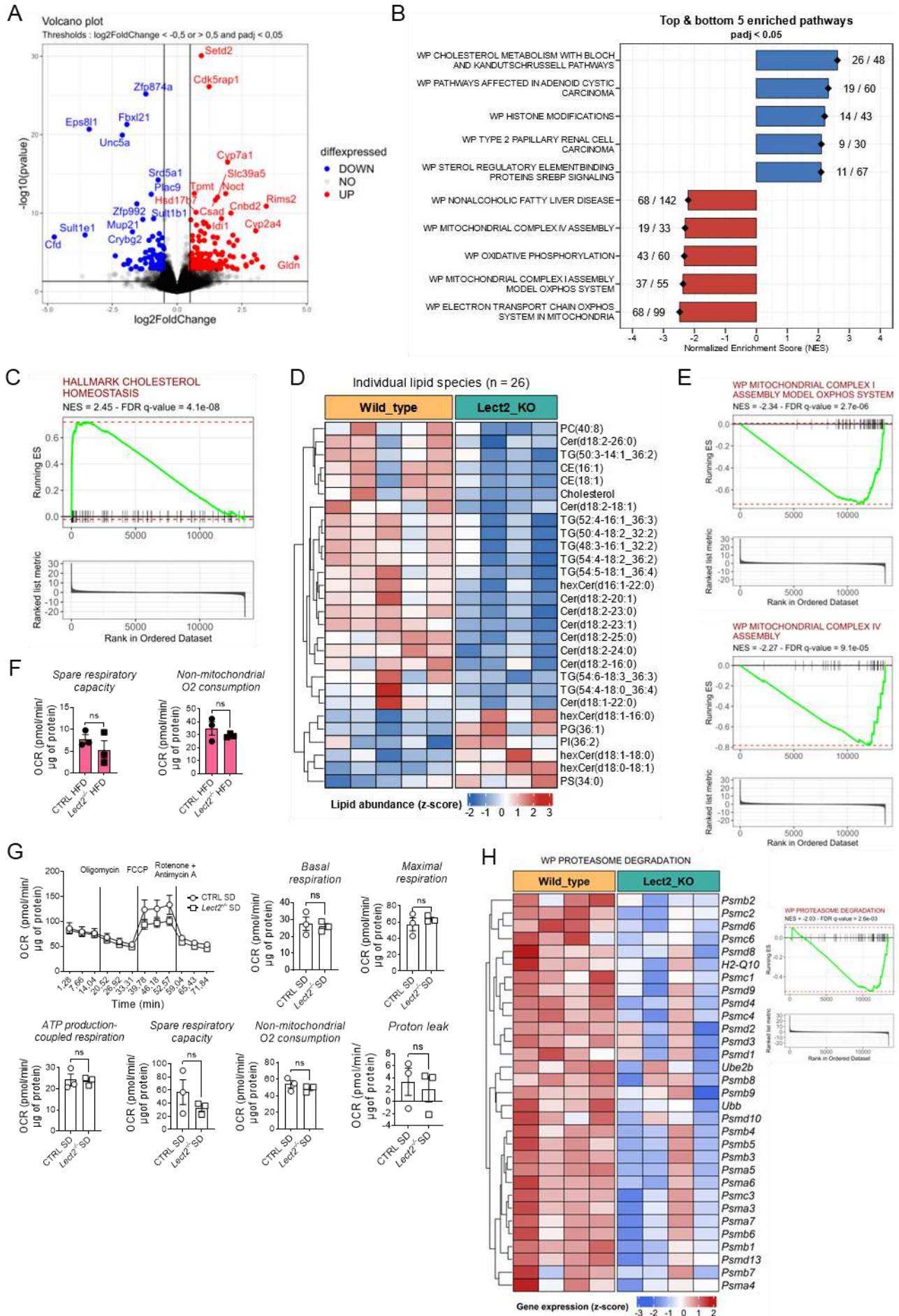
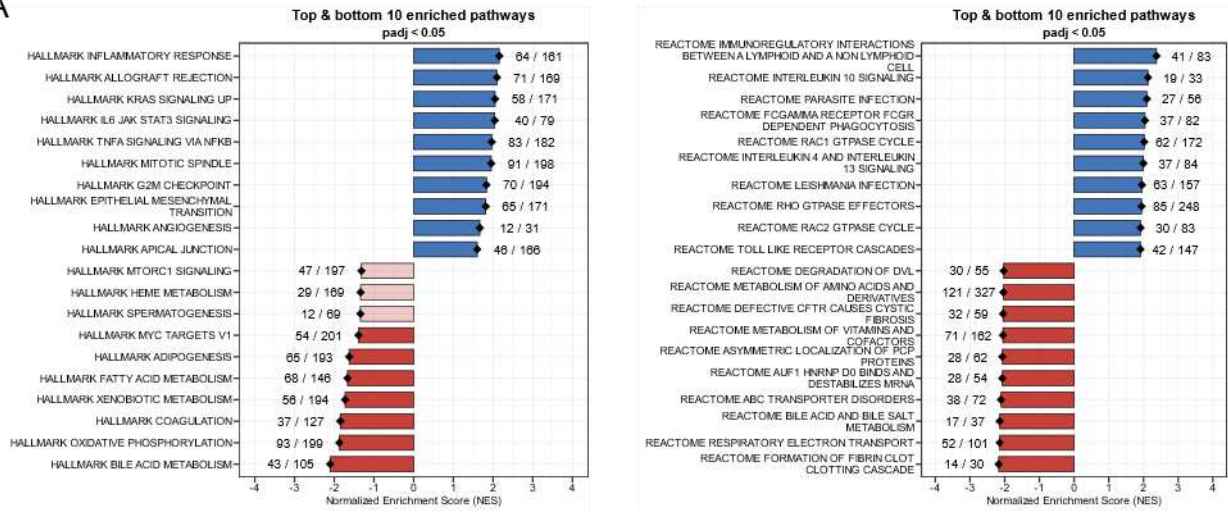
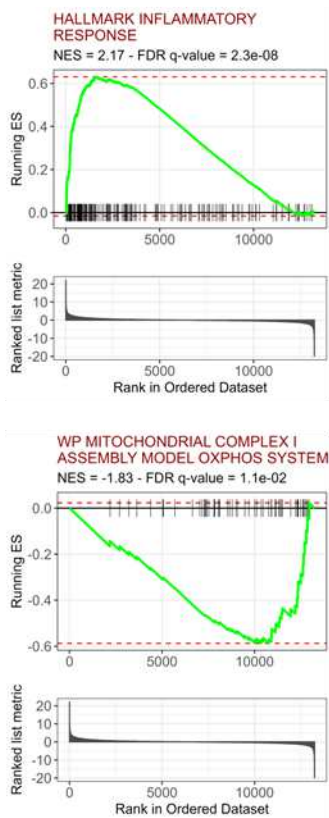


Figure S4. Related to Figure 6.

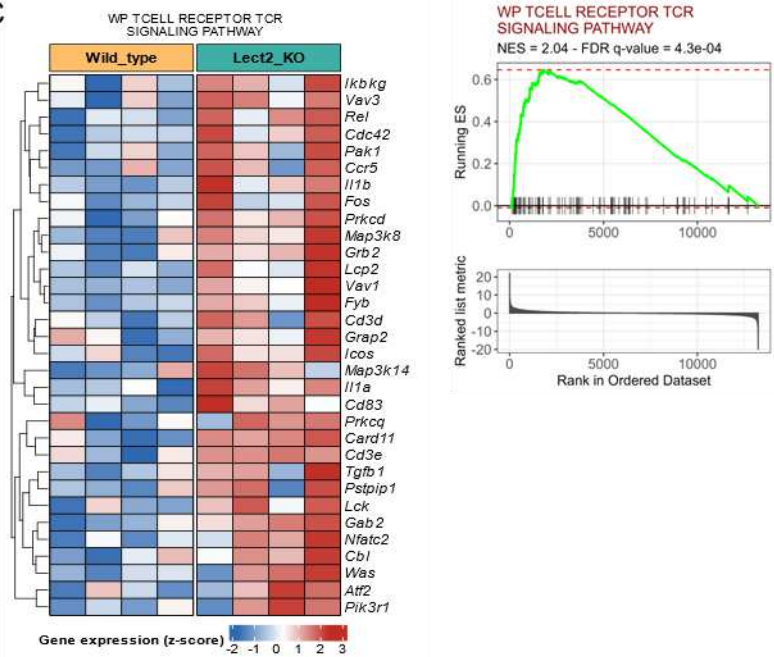
A



B



C



Supplemental table 1.

Primer	Forward Primer	Reverse Primer
18s	GTAACCCGTTGAACCCATT	CCATCCAATCGGTAGTAGCG
Abcb4	CTACGACCCACAGAGGG TA	ACGGGCTCTTGACTTACCAC
Abcb11	CCAGAACATGACAAACGGAA	AAGGACAGCCACACCAACTC
Abcg5	TCGCCACGGTCATTTTCA	GCCAAAAGAGCAGCAGAGAAATA
Abcg8	ATCCATTGGCCACCCTTGT	GCGTCTGTCGATGCTGGT C
Acc	GGGACTTCATGAATTTGCTGATTCTCAGTT	GTCATTACCATCTTCATTACCTCAATCT
Caspase-1	AGGAATTCTGGAGCTTCAATCAG	TGGAAATGTGCCATCTTCTTT
Ccl2	TCTGGGCCTGCTGTTTACA	GGATCATCTTGCTGGTGAATGA
ChREBP	AATGGGATGGTGTCTACCGC	GGCGAAGGGAATTCAGGACA
Cox6	CATTGGCTACCATGAGTTCC	CAGCCACGCCAAACTTATAG
Cyp7a1	AGA GCA ACT AAA CAA CCT GCC AGT A	GCA CTG GAG AGC CGC AGA
Cyp8b1	TCC TCA GGG TGG TAC AGG AG	GAT AGG GGA AGA GAG CCA CC
Fas	TTCCAAGACGAAAATGATGC	AATTGTGGGATCAGGAGAGC
Hba1	ATCCCGTCAACTTCAAGC	AACGGTACTTGGAGGTCAGC
HMG-CoA Synthase	TGCACGGATCGTGAAGACA	GTCTCTCCATCAGTTTCTGAACCA
Gprx3	ATCCTGCCTTCTGTCCCTGCTC	TGGTGAGGGCTCCATACTCGTA
Il-6	GAGGATACCACTCCCAACAGACC	AAGTGCATCATCGTTGTTTCATACA
Lect2	TAGCAGGACCATGGGCTAAC	GCCCACTATCTTCCCAGTGA
Mvd	CACGTGGCGTCAGTGAAC	CCTGAGCCAGGGTATAGGC
Nfe2l1	AGAACGAGAGGACACCTGGTCA	GCTTCTGGGATGCTGGAAACGT
Nfe2l2	AGGACATGGAGCAAGTTTGG	TCTGTCAGTGTGGCTTCTGG
Nlrp3	GCTCCAACCATTCTCTGACC	AAGTAAGGCCGGAATTCACC
Nrf1	TTGATGGACACTTGGGTAGC	GCCAGAAGGACTGAAAGC
Nrf2	TACAGCTTAGTGTACAGGTA	CCCGGTGAACTTCTGTCTTC
Srebf2	CCCTATTCCATTGACTCTGAGC	GAGTCCGGTTCATCCTTGAC
Sqle	GATGGGCATTGAGACCTTCT	TTTAAAAGAGCCCGACAGGA
Srebp1	CCACTAAGGTGCCTACAGAGC	AACGTCACTTCCAGCTAGAC
Tgfb	TGGCGTTACCTTGGTAACC	GGTGCTGGGCCCTTCCAG
Tmem126b	TTGGTCCGAGTCGAAGGTTG	TGCCATCTTGATGTCCTGGG

FIGURE LEGENDS

TABLE 1. Summary of the clinical parameters used to constitute the patient cohort.

Without NAFLD: obese patients with normal liver histology. With NAFLD: obese patients with steatosis without or with NASH. Data are expressed as mean \pm SEM and compared using the non-parametric Mann Whitney test for quantitative values and or Chi² test for qualitative values.

FIGURE 1. *Lect2* modulates the lipogenic response under physiological conditions.

A. Representative barplot of differentially enriched gene sets (q-value < 0,05) in CTRL and *Lect2*^{-/-} livers under standard diet in the feeding state. Shown data are representative of 4 independent samples per group. **B.** Representative heatmap showing differentially expressed genes related to cholesterol homeostasis between CTRL and *Lect2*^{-/-} livers under standard diet in the feeding state from the Hallmark database. Shown data are representative of 4 independent samples per group. **C.** CTRL and *Lect2*^{-/-} mice have been subjected to fasting and refeeding experiment. Mice indicated as Fasted were fasted for a 24h period prior to sacrifice. Mice indicated as Refed were fasted for 24h, followed by a 18h refeeding period before sacrifice. **D.** Body weight (left) and blood glucose (middle) of fasted and refed CTRL and *Lect2*^{-/-} mice. RT-qPCR analysis of *Lect2* in livers of fasted and refed CTRL mice (right). * p-value < 0,05 (Student t test), data represented as mean \pm SEM, n= 4-8 per group. **E.** Representative H&E staining of paraffin-embedded sections obtained from CTRL and *Lect2*^{-/-} livers. **F.** Representative images of Oil Red O staining of CTRL and *Lect2*^{-/-} liver cryosections, and its quantification. * p-value < 0,05 (Student t-test), data represented as mean \pm SEM, n= 4-8 per group. **G.** Quantification of liver triglyceride content. ns p-value > 0.05 ; * p-value < 0,05 (Student t-test), data represented as mean \pm SEM, n=4 per group. **H.** RT-qPCR analysis of *Srebp1c*, *Chrebp*, *Fas* and *Acc* in fasted CTRL and *Lect2*^{-/-} livers. ns p-value > 0.05 ; * p-value < 0,05 (Student t-test), data represented as mean \pm SEM, n= 3-8 per group. **I.** Representative Oil Red O staining in primary hepatocytes isolated from CTRL and

Lect2^{-/-} mice cultured for 36 hours (left). Quantification of positive Oil Red O areas reported to total number of nuclei (right). ** p-value < 0,01 (Student t-test), data represented as mean ± SEM, n=5 per group.

FIGURE 2. *Lect2* regulates hepatic cholesterol metabolism and fatty acid synthesis in an LXR-dependent manner.

A. RT-qPCR analysis of genes involved in cholesterol synthesis (left panel) and cholesterol catabolism through bile acids (right panel) in fed livers of CTRL and *Lect2*^{-/-} mice. * p-value < 0,05 ; ** p-value < 0,01 ; *** p-value < 0,001 ; **** p-value < 0,0001 (Student t-test), data represent mean ± SEM, n=5 per group. **B.** Quantitative measurement of total cholesterol assessed by mass spectrometry in CTRL and *Lect2*^{-/-} livers. **C.** Experimental procedure for LXRE activity test : primary hepatocytes from CTRL and *Lect2*^{-/-} mice were transfected with the reporter construct pTK-3xLXRE-luc for 24 hours and then treated with T0-901317 or DMSO for 24 hours before luciferase measurement. **D.** Relative expression of luciferase activity, in CTRL and *Lect2*^{-/-} hepatocytes, treated with DMSO or T0-901317. *** p-value < 0,001 (one-way ANOVA), data represented as mean ± SEM, representative of 3 independent experiments performed in triplicate. **E.** Quantitative measurement of 25-hydroxycholesterol (25-OHC) content assessed by mass spectrometry in CTRL and *Lect2*^{-/-} livers. * p-value < 0,05 (Student t-test), data represent min to max values, n=5 per group. **F.** Experimental procedure for *Lect2* rescue : *Lect2*^{-/-} mice received a single retro-orbital intravenous injection of 2,75x10¹⁰ vg of AAV-*Lect2* two weeks before experiment. **G.** *Lect2* mRNA expression was assessed by RT-qPCR in livers from CTRL, *Lect2*^{-/-} and *Lect2*^{Rescue} mice. * p-value < 0,05 ; ** p-value < 0,01 (one-way ANOVA), data represented as mean ± SEM, n=3-7 per group. **H.** *Lect2* protein expression in livers from CTRL, *Lect2*^{-/-} and *Lect2*^{Rescue} mice. HSC70 was used as a loading control. Lanes show samples from independent biological replicates. **I.** Relative expression of luciferase activity in CTRL, *Lect2*^{-/-} and *Lect2*^{Rescue} hepatocytes treated with T0-901317 or DMSO. ** p-value < 0,01 ; *** p-value < 0,001 (one-way ANOVA), data represented as mean ± SEM, representative of 3 independent experiments performed in triplicate. **J.** RT-qPCR analysis of genes involved in cholesterol catabolism and degradation through bile acids in CTRL, *Lect2*^{-/-} and *Lect2*^{Rescue} livers. ns p-value > 0.05 ; * p-value < 0,05 ; ** p-value < 0,01 ; *** p-

value < 0,001 (one-way ANOVA), data represented as mean \pm SEM, n= 3-7 per group. **K.** Correlation between *Lect2* mRNA levels and *Cyp7a1*, *Abcg5* and *Abcg8* mRNA levels. Single values were plotted, and the correlation was assessed by calculating Spearman rank-order correlation, statistical significance was assessed in a Student t-test. **L.** RT-qPCR analysis of genes involved in lipogenesis in livers of CTRL, *Lect2*^{-/-} and *Lect2*^{Rescue} mice fasted for 24h. * p-value < 0,05 ; ** p-value < 0,01 (one-way ANOVA), data represented as mean \pm SEM n= 4-7 per group.

FIGURE 3. Lect2 expression is increased in fatty livers of mouse models and in obese patients.

A. RT-qPCR analysis of *Lect2* in livers of CTRL mice fed a standard (SD), high fat high sucrose (HFHS), choline-deficient high fat (CD-HFD), methionine and choline-deficient (MCD) diets, and genetically obese *ob/ob* mice. ** p-value < 0.01 ; *** p-value < 0,001 ; **** p-value < 0.0001 (Student t test), data represented as mean \pm SEM, n=3-11 per group. **B.** RT-qPCR analysis of *Lect2* in liver biopsies of obese patients, without steatosis (w/o NAFLD, n=7) and with steatosis (NAFLD, n= 30). *** p-value < 0,001 (Mann-Whitney test), data represented as mean \pm SEM. **C.** Correlation between the expression of *Lect2* and HOMA-IR, blood insulin and blood triglycerides levels. Single values were plotted, and the correlation was assessed by calculating Spearman rank-order correlation, statistical significance was assessed in a Student t-test. **D.** Correlation between the expression of *Lect2* and steatosis score, NAS score and serum alanine aminotransferase (ALT) levels. Single values were plotted, and the correlation was assessed by calculating Spearman rank-order correlation, statistical significance was assessed in a Student t-test.

FIGURE 4. Lect2 is induced in high fat diet-fed livers and secreted by fatty hepatocytes but does not affect lipid storage.

A. 6 weeks old CTRL and *Lect2*^{-/-} males were fed standard (SD) or high fat diet (HFD). *Lect2* mRNA level was evaluated by qPCR after 20 weeks of diet. **** p-value < 0,0001 (Student t test), data represented as mean \pm SEM, n=9 per group. **B.** Insulin tolerance test after 10 weeks of diet. * p-value < 0,05 ; ** p-value < 0,01 (2-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparisons test), data represented as

mean \pm SEM, n=5 per group. **C.** Oral glucose tolerance test after 8 weeks of diet. * p-value $< 0,05$; ** p-value $< 0,01$ (2-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparisons test), data represented as mean \pm SEM, n=3-5 per group. **D.** Representative H&E staining of paraffin-embedded sections obtained from CTRL and *Lect2*^{-/-} livers under HFD for 20 weeks. **E.** Representative H&E staining and *Lect2* RNAscope of paraffin-embedded sections obtained from CTRL livers under standard diet or HFD for 20 weeks. **F.** Steatosis, inflammation and hepatocellular injury were evaluated in CTRL and *Lect2*^{-/-} livers under HFD for 20 weeks using a discrete scoring system, and NAFLD activity score (NAS) was calculated from these values. ns p-value $> 0,05$ (Mann-Whitney test), n=9-10 per group. **G.** Quantification of serum aspartate aminotransferase (ASAT) from CTRL and *Lect2*^{-/-} mice under standard diet and HFD for 20 weeks. ns p-value $> 0,05$; * p-value $< 0,05$; ** p-value $< 0,01$; **** p-value $< 0,0001$ (one-way ANOVA followed by Šídák's multiple comparisons test), data represented as mean \pm SEM, n= 5-8 per group.

FIGURE 5. *Lect2* regulates cholesterol metabolism homeostasis and maintains mitochondrial integrity during NAFLD.

A. Representative barplot of differentially enriched gene sets (q-value $< 0,05$) in CTRL and *Lect2*^{-/-} livers after 20 weeks of HFD from the C2:Reactome database. For each gene set, the number of differentially expressed genes out of the total gene set size is indicated. Shown data are representative of 4 independent samples per group. **B.** Representative heatmap showing differentially expressed genes related to cholesterol homeostasis between CTRL and *Lect2*^{-/-} livers after 20 weeks of HFD from the Hallmark database. Shown data are representative of 4 independent samples per group. **C.** RT-qPCR analysis of *Cyp7a1*, *Abcb4*, *Abcb11*, *Abcg5* and *Abcg8* in CTRL and *Lect2*^{-/-} livers under standard diet and HFD for 20 weeks. ns p-value $> 0,05$; * p-value $< 0,05$; *** p-value $< 0,001$ (one-way ANOVA followed by Šídák's multiple comparisons test), data represented as mean \pm SEM, n= 6-10 per group. **D.** Quantification of total and esterified cholesterol from CTRL and *Lect2*^{-/-} livers under HFD for 20 weeks. ns p-value $> 0,05$; * p-value $< 0,05$; ** p-value $< 0,01$ (Student t test), data represented as mean \pm SEM, n=4-5 per group. **E.** Representative heatmap showing differentially expressed genes related to mitochondrial complexes I (left) and IV (right) assembly between CTRL and *Lect2*^{-/-}

livers after 20 weeks of HFD from the Hallmark database. Shown data are representative of 4 independent samples per group. **F.** Seahorse analysis of mitochondrial stress in primary hepatocytes from CTRL and *Lect2*^{-/-} mice fed HFD for 4 weeks. ns p-value > 0,05 ; * p-value < 0,05 (Student t test), data represented as mean ± SEM, n=3 per group. **G.** Quantification of mitochondrial content in primary hepatocytes from CTRL and *Lect2*^{-/-} livers under standard diet or HFD for 4 weeks. ns p-value > 0,05 (one-way ANOVA followed by Šídák's multiple comparisons test), data represented as mean ± SEM, n=3-5 per group. **H.** RT-qPCR analysis of antioxidant response-related genes (*Hmox1*, *Nqo1*, *Gstm3*, *Hba1* and *Gpx3*) in CTRL and *Lect2*^{-/-} livers under standard diet and HFD for 20 weeks. ns p-value > 0,05 ; * p-value < 0,05 ; ** p-value < 0,01 ; *** p-value < 0,001 ; **** p-value < 0,0001 (one-way ANOVA followed by Šídák's multiple comparisons test), data represented as mean ± SEM, n= 6-10 per group. **I.** RT-qPCR analysis of *Nfe2L1* and *Nfe2L2* in CTRL and *Lect2*^{-/-} livers under standard diet and HFD for 20 weeks. ns p-value > 0,05 ; * p-value < 0,05 ; ** p-value < 0,01 ; *** p-value < 0,001 (one-way ANOVA followed by Šídák's multiple comparisons test), data represented as mean ± SEM, n= 6-10 per group.

FIGURE 6. *Lect2* attenuates NASH progression by reducing lipotoxicity and inflammation.

A. 5 weeks old CTRL and *Lect2*^{-/-} males were put under standard or HFHC diet. Liver weight/body weight ratio was calculated at sacrifice. *Lect2* mRNA was evaluated by qPCR after 24 weeks of diet. ns p-value > 0,05 ; ** p-value < 0,01 ; **** p-value < 0,0001 (one-way ANOVA followed by Šídák's multiple comparisons test ; Student t test), n=5-11 per group. **B.** Representative H&E staining and *Lect2* RNAscope of paraffin-embedded sections obtained from CTRL and *Lect2*^{-/-} livers under standard diet or HFHC for 24 weeks. **C.** Steatosis, inflammation and hepatocellular injury were evaluated in CTRL and *Lect2*^{-/-} livers under HFHC for 24 weeks using a discrete scoring system, and NAFLD activity score (NAS) was calculated from these values. Fibrosis score was evaluated separately. ns p-value > 0,05 ; * p-value < 0,05 ; ** p-value < 0,01 (Mann-Whitney test ; Fisher's exact test), n=9-11 per group. **D.** Representative barplot of differentially enriched gene sets (q-value < 0,05) in CTRL and *Lect2*^{-/-} livers after 24 weeks of HFHC from the C2:Wikipathways database. For

each gene set, the number of differentially expressed genes out of the total gene set size is indicated. Data shown are representative of 4 independent samples per group. **E.** Representative heatmaps showing differentially expressed genes related to inflammatory response and mitochondrial complex I assembly between CTRL and *Lect2*^{-/-} livers after 24 weeks of HFHC from the Hallmark and C2:Wikipathways databases. Shown data are representative of 4 independent samples per group. **F.** Quantitative real-time RT-qPCR analysis of *Nlrp3*, *Caspase1*, *Ccl2*, *Il6*, and *Tgfb* in CTRL and *Lect2*^{-/-} livers under standard diet and HFHC for 24 weeks. ns p-value > 0,05 ; * p-value < 0,05 ; ** p-value < 0,01 ; **** p-value < 0,0001 (one-way ANOVA followed by Šídák's multiple comparisons test), n=4-11 per group. **G.** Representative heatmap of differentially concentrated lipid species in livers from CTRL and *Lect2*^{-/-} mice fed HFHC for 24 weeks. Shown data are representative of 4 independent samples per group. **H.** Molar ration of phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine quantified from CTRL and *Lect2*^{-/-} livers under HFHC for 24 weeks. ** p-value < 0.01 (Student t test), n=4 per group.

FIGURE 7. *Lect2* displays antitumoral properties in a metabolic-induced pro-tumoral environment.

A. 6 weeks old CTRL and *Lect2*^{-/-} males were put under standard or CD-HF diet for 36 or 52 weeks. **B.** Percentage of tumor-bearing mice among CTRL and *Lect2*^{-/-} groups. Data represented as mean ± SEM, n=12 CTRL and 8 *Lect2*^{-/-}. **B.** Number of nodules per mouse in CTRL and *Lect2*^{-/-} groups. Data represented as mean ± SEM, n=12 CTRL and 8 *Lect2*^{-/-}. **C.** Percentage of steatotic (left) and infiltrated (middle) tumors among CTRL and *Lect2*^{-/-} groups. Mean number of Ki67-positive hepatocytes per field in tumors from CTRL and *Lect2*^{-/-} mice. Data represented as mean ± SEM, n=12 CTRL and 8 *Lect2*^{-/-}. **E.** Representative H&E and Ki67 staining of paraffin-embedded sections obtained from CTRL and *Lect2*^{-/-} livers under CD-HFD for 52 weeks.

FIGURE S1. *Lect2* regulates lipogenesis under physiological conditions.

A. Gene set enrichment analysis (GSEA) enrichment score for the transcriptomic profiles of CTRL and *Lect2*^{-/-} livers under standard diet, based on MSigDB collections

Hallmark, C2:Reactome and C5:Gene Ontology. **B.** RT-qPCR analysis of *Srebp1c* in fasted and refed CTRL livers. ** p-value < 0,01 (Student t test). Data represented as mean \pm SEM, n=6 fasted and 8 refed. **C.** RT-qPCR analysis of *Srebp1c*, *Chrebp*, *Fas* and *Acc* in refed CTRL and *Lect2*^{-/-} livers. ns p-value > 0.05 (Student t-test), data represented as mean \pm SEM, n= 3-8 per group. **D.** ACC protein expression in livers from fasted CTRL and *Lect2*^{-/-} mice, and its quantification. HSC70 was used as loading control. Lanes show samples from independent biological replicates. ** p-value < 0,01 (Student t-test), data represented as mean \pm SEM, n=3 per group. **E.** CTRL and *Lect2*^{-/-} primary hepatocytes were stained with oil red O, which was eluted and quantified by optical density measurement at 492 nm. ** p-value < 0,01 (Student t test), data represented as mean \pm SEM, n=5 per group.

FIGURE S2. *Lect2* deficiency impacts on cholesterol metabolism, promoting a selective enrichment of oxysterol 25-OHC.

A. Quantitative measurement of 27-OHC, 7-ketocholesterol, 7 α and 7 β -hydroxycholesterol content assessed by mass spectrometry in CTRL and *Lect2*^{-/-} livers. Data represent min to max values, n=5 per group.

FIGURE S3. *Lect2* regulates cholesterol homeostasis during steatosis and is necessary for efficient mitochondrial function.

A. Volcano plot representing differentially expressed genes (q-value < 0,05 and log₂FoldChange < -0,05 or > 0,05) in livers from CTRL and *Lect2*^{-/-} mice fed HFD for 20 weeks. Data are representative of 4 individual samples per group. **B.** Representative bar plots of differentially enriched gene sets (q-value < 0,05) in CTRL and *Lect2*^{-/-} livers after 20 weeks of HFD from C2:Wikipathways databases. For each gene set, the number of differentially expressed genes out of the total gene set size is indicated. Shown data are representative of 4 independent samples per group. **C.** GSEA enrichment score for the transcriptomic profiles of CTRL and *Lect2*^{-/-} livers under HFD for 20 weeks, based on MSigDB collection Hallmark. **D.** Representative heatmap of differentially concentrated lipid species in livers from CTRL and *Lect2*^{-/-} mice fed HFD for 20 weeks. Shown data are representative of 4 independent samples per group. **E.** GSEA enrichment score for the transcriptomic profiles of

CTRL and *Lect2*^{-/-} livers under HFD for 20 weeks, based on MSigDB collection C2:Wikipathways. **F.** Spare respiratory capacity and non-mitochondrial O₂ consumption of primary hepatocytes from CTRL and *Lect2*^{-/-} livers under HFD for 20 weeks as measured by SeaHorse. ns p-value > 0,05 (Student t test), data represented as mean ± SEM, n=3 per group **G.** Seahorse analysis of mitochondrial stress in primary hepatocytes from CTRL and *Lect2*^{-/-} mice under standard diet. ns p-value > 0,05 (Student t test), data represented as mean ± SEM, n=3 per group. **H.** Representative heatmap (left) and GSEA enrichment score (right) showing differentially expressed genes related to proteasome degradation between CTRL and *Lect2*^{-/-} livers after 24 weeks of HFHC from the C2:Wikipathways database. Shown data are representative of 4 independent samples per group.

FIGURE S4. *Lect2* deficiency causes an exacerbated inflammatory response during cholesterol overload.

A. Representative bar plots of differentially enriched gene sets (q-value < 0,05) in CTRL and *Lect2*^{-/-} livers after 24 weeks of HFHC from Hallmark and C2:Reactome databases. For each gene set, the number of differentially expressed genes out of the total gene set size is indicated. Shown data are representative of 4 independent samples per group. **B.** GSEA enrichment score for the transcriptomic profiles of CTRL and *Lect2*^{-/-} livers under HFHC for 24 weeks, based on MSigDB collections Hallmark and C2:Wikipathways. **C.** Representative heatmap (left) and GSEA enrichment score (right) showing differentially expressed genes related to T cell receptor signaling between CTRL and *Lect2*^{-/-} mice fed HFD for 20 weeks. Shown data are representative of 4 independent samples per group.

DISCUSSION

DISCUSSION

Ces travaux de thèse combinés ont permis de montrer que la protéine LECT2 est un acteur important dans la régulation du métabolisme lipidique dans le foie, par son action sur la lipogenèse *de novo* et l'homéostasie du cholestérol à travers le récepteur nucléaire LXR. En physiologie, la délétion de LECT2 chez la souris provoque une augmentation de l'expression des gènes cibles de LXR intervenant dans la synthèse d'acides gras, et de la biosynthèse du cholestérol ainsi que son export sous forme d'acides biliaires. L'activité de LXR est fortement augmentée et s'accompagne d'une accumulation de l'oxystérol 25-OHC qui est un de ses ligands activateurs. En conditions de stéatose, l'expression de LECT2 est induite, à la fois dans les hépatocytes centro-lobulaires et ceux contenant des gouttelettes lipidiques. L'absence de LECT2 provoque une nouvelle fois l'augmentation de la synthèse du cholestérol, cependant l'export via les acides biliaires est supérieur à la synthèse. Conjointement, les fonctions mitochondriales sont affectées, et les capacités respiratoires et la production d'énergie sont diminuées. En surchargeant les hépatocytes en cholestérol, l'expression de LECT2 est maintenue à des niveaux physiologiques, toutefois l'absence de LECT2 dans ces conditions provoque des lésions tissulaires, de l'inflammation, et de la fibrose. Le contenu en espèces lipotoxiques est augmenté dans les foies déficients en LECT2, et un dysfonctionnement mitochondrial est de nouveau observé. Enfin, l'absence à long terme de LECT2 sous un régime récapitulant la séquence des NAFLD favorise l'émergence de tumeurs hépatiques, ce qui lui confère de fortes propriétés antitumorales.

Nos travaux nous amènent à nous poser plusieurs questions. Comment LECT2 régule-t-il l'activité de LXR ? Quels processus moléculaires LECT2 contrôle-t-il dans les NAFLD ? Est-ce que LECT2 pourrait être utilisé comme un biomarqueur de la progression des NAFLD ?

I. LECT2 et régulation de la voie LXR

A) Lien entre LECT2, lipogenèse et oxydation des acides gras

Comme abordé dans l'introduction, la lipogenèse et l'oxydation des acides gras sont mutuellement exclusives. La première permet de consommer le glucose et former des réserves en conditions post-prandiales, lorsque les niveaux d'insuline et de glucose sont élevés, tandis que la seconde permet de générer de l'énergie en conditions de jeûne.

Cependant, nos résultats montrent une induction de la lipogenèse, notamment des acteurs clés SREBP1c, FAS et ACC, en conditions de jeûne en absence de LECT2, ce qui s'accompagne d'une forte augmentation de l'activité de LXR. Or, LXR est un régulateur majeur de l'équilibre entre stockage et oxydation des acides gras. En effet, dans un modèle *LXRα/β^{-/-}*, la mise sous régime gras enrichi en cholestérol n'induit pas d'obésité, et ceci en raison d'une β-oxydation élevée (*Kalaany et al., 2005*). De plus, les souris *Lect2^{-/-}* semblent avoir une dépense énergétique plus élevée comparativement à des souris contrôles (*Lan et al., 2014*). L'hypothèse qui s'impose alors est que LECT2 pourrait réprimer la lipogenèse *de novo* via LXR/SREBP1c en favorisant la β-oxydation. Pour explorer l'équilibre entre ces deux voies métaboliques, il semble pertinent de s'intéresser à PPARα et l'AMPK.

PPARα intervient dans la régulation de l'oxydation des acides gras en conditions de jeûne (*Kersten et al., 1999*), son activation induit l'expression de CPT1 et CPT2 impliqués dans la β-oxydation, et HMGCS2 qui intervient dans la céto-genèse (*Pawlak et al., 2015*). De manière intéressante, il a été montré que LXR pouvait inhiber l'activité de PPARα en se liant à RXR, son partenaire (*Ide et al., 2003*), et que réciproquement, PPARα pouvait inhiber LXR (*Yoshikawa et al., 2003*). De plus, un des ligands de PPARα, le 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (C16:0/C18:1) de la classe des phosphatidylcholines, est produit par la lipogenèse sous le contrôle de LXR (*Chakravarthy et al., 2009, 2005*). Il a également été montré que LXR induit l'expression de gènes intervenant dans l'oxydation des acides gras dépendante de PPARα (*Ducheix et al., 2013*). Enfin, l'inactivation hépatique de PPARα provoque de la stéatose lorsque les animaux sont mis à jeun, puisque la β-oxydation est inhibée (*Montagner et al., 2016*). En étroite collaboration avec PPARα, on peut nommer l'AMPK, qui inhibe la lipogenèse et favorise l'oxydation via la déplétion en malonyl-coA par ACC (*Foretz et al., 2005*). Or, il a été montré que l'expression de LECT2 est liée au niveau d'activation de l'AMPK (*Lan et al., 2014*), et nos résultats montrent une augmentation de l'expression d'ACC en absence de LECT2 à jeun, suggérant une inhibition de la voie d'oxydation. De plus, il a été rapporté que l'AMPK peut induire l'expression de PPARα (*Bronner et al., 2004*) et inhiber l'activité de LXR (*Hwahng et al., 2009*). Pour définir plus précisément au niveau moléculaire l'implication de LECT2, il serait donc pertinent de quantifier l'expression de PPARα et ses cibles, ainsi que le niveau d'activation de l'AMPK dans les foies de souris *Lect2^{-/-}* et *Lect2^{RESCUE}* en conditions à jeun. Ainsi, il serait possible d'établir les mécanismes par lesquels LECT2 régule l'équilibre entre β-oxydation des acides gras et lipogenèse.

B) LECT2, LXR et oxystérols

Nos résultats ont montré que LECT2 était nécessaire pour le maintien de l'homéostasie du cholestérol dans le foie. En conditions physiologiques, bien que le contenu en cholestérol soit similaire entre des souris contrôle et *Lect2*^{-/-}, la synthèse et l'export sous forme d'acides biliaires sont fortement induits dans ces dernières. Toutefois, nous avons mesuré un enrichissement en 25-OHC, qui est un oxystérol capable d'activer LXR, mais qui a également été montré comme un régulateur négatif de la biosynthèse du cholestérol, puisque sa liaison avec INSIG permet la rétention de SCAP/SREBP2 dans le RE (*Adams et al., 2004; Radhakrishnan et al., 2007*). Or, nos résultats montrent clairement une augmentation de l'expression des cibles de SREBP2 dans les foies *Lect2*-déficients. Cette accumulation peut avoir deux origines possibles : soit une absence de dégradation du 25-OHC par l'oxysterol 7- α hydroxylase CYP7B1 (*Li-Hawkins et al., 2000*), soit une augmentation de l'activité de l'enzyme qui le synthétise à partir du cholestérol, la cholestérol 25-hydroxylase (Ch25H) (*Diczfalusy, 2013*). Récemment, LXR a été impliqué dans la régulation transcriptionnelle de la Ch25H. L'administration *in vivo* de l'agoniste de LXR GW3965 provoque une augmentation de l'expression de la Ch25H par les macrophages péritonéaux. *In vitro*, l'agoniste T091317 et le 25-OHC induisent une augmentation de l'expression de Ch25H dans la lignée hépatocytaire HepG2, suggérant un mécanisme de rétrocontrôle entre LXR et le 25-OHC pour le maintien de l'homéostasie du cholestérol (*Y. Liu et al., 2018*). D'après ces données, il semble pertinent de quantifier l'expression de la Ch25H dans nos souris contrôle, *Lect2*^{-/-} et *Lect2*^{RESCUE}. Aussi, pour discriminer une éventuelle action directe de LECT2 sur la synthèse de 25-OHC de l'implication de LXR, il serait intéressant d'invalider l'expression hépatique de LXR à l'aide d'une construction CRISPR/Cas9 par exemple puis de quantifier le 25-OHC et l'expression de la Ch25H dans nos différents groupes. De plus, l'expression de la Ch25H hépatique est fortement induite *in vivo* après un traitement par un agoniste du TLR4 (*Bauman et al., 2009*). Or, puisque le foie est constamment exposé à des antigènes bactériens provenant des intestins via la circulation portale, il est possible que l'induction de la Ch25H dans les souris *Lect2*^{-/-} puisse être le résultat d'une altération du microenvironnement hépatique. La production de LECT2 est majoritairement hépatique, mais il est également produit par l'épithélium intestinal (*Phesse et al., 2008*). Le modèle murin que nous utilisons est un *knock-out* total, et donc l'absence d'expression de LECT2 au niveau des intestins pourrait altérer la composition du microbiote ou la perméabilité intestinale si on considère LECT2 comme un peptide anti-microbien (*J. Chen et al., 2014; Lu et al., 2013; H.-L. Ma et al.,*

2016). Il serait donc pertinent de vérifier nos résultats dans un modèle de délétion de LECT2 hépato-spécifique.

C) Voie(s) de signalisation de LECT2

Nous avons mis en évidence les effets directs de LECT2 sur le métabolisme des hépatocytes à travers sa réexpression dans les souris déficientes à l'aide d'un AAV8-*Lect2*. Nous sommes parvenus à restaurer l'activité de LXR et l'expression de ces cibles à des niveaux quasi-physiologiques. Malgré l'identification de plusieurs récepteurs sur l'hépatocyte et d'autres types cellulaires, un mode de signalisation précis par LECT2 n'a pas encore été décrit. Parmi ces récepteurs, cMET présente un grand intérêt en raison de sa similarité avec le récepteur à l'insuline. En effet, cMET peut se dimériser avec le récepteur à l'insuline et induire une signalisation insulinémique permettant la régulation de l'homéostasie du glucose (*Fafalios et al., 2011*). De plus, LECT2 induit la déphosphorylation de cMET en recrutant la phosphatase PTP1B (*C.-K. Chen et al., 2014*), il semble donc judicieux d'analyser l'état de phosphorylation de cMET dans les souris contrôle, *Lect2*^{-/-} et *Lect2*^{RESCUE}. Cependant, il est indispensable au préalable de développer un modèle déficient en LECT2 hépatospécifique.

LECT2 est une cible de la β -caténine (*Ovejero et al., 2004*), un régulateur important de la zonation métabolique. Comme abordé en introduction, selon leur localisation dans le lobule hépatique, les hépatocytes n'ont pas les mêmes fonctions métaboliques. Les hépatocytes périportaux participent surtout à l'oxydation des acides gras, tandis que les hépatocytes périveineux sont spécialisés dans la lipogenèse. Or, LECT2 est exprimé dans ces derniers, où le complexe de rétention de la β -caténine, *adenomatous polyposis coli* (APC) n'est pas activé (*Benhamouche et al., 2006*). La zonation métabolique n'est pas un phénomène figé, puisque à jeun, l'oxydation et la cétogenèse sont induites dans les hépatocytes périveineux et la lipogenèse est inhibée, afin de répondre aux besoins énergétiques de l'organisme (*Guzmán et al., 1995*). De façon intéressante, la déficience en *Ctnnb1* (le gène de la β -caténine) provoque des défauts de β -oxydation ainsi que des altérations mitochondriales (*Behari et al., 2014*), et nous pouvons facilement penser que LECT2 pourrait être impliqué dans ce phénotype, puisque nous pensons qu'il favorise la β -oxydation et inhibe la lipogenèse. De plus, nous avons pu localiser l'expression de LECT2 dans le parenchyme hépatique stéatosique, et nous avons mis en évidence son expression à la fois par les hépatocytes périveineux et les hépatocytes stéatosiques. Or, dans ces conditions il est nécessaire

d'identifier les territoires d'expression de la β -caténine afin de confirmer que l'extension de la zone d'expression de LECT2 est bien due à son facteur de transcription principal, ou si dans ce contexte il existerait d'autres inducteurs de LECT2.

II. Expression de LECT2 dans les NAFLD

A) LECT2 et résistance à l'insuline

L'installation de la résistance à l'insuline est un moment crucial dans le développement des NAFLD, et elle est fortement dépendante des espèces lipidiques accumulées. En réponse à cette dérégulation de l'homéostasie glycémique, le foie sécrète des hépatokines qui peuvent avoir des effets positifs et améliorer la résistance à l'insuline, telles que FGF21, ou au contraire, entretenir l'insulinorésistance, telles que la fétuine A. LECT2 a été qualifié d'hépatokine en raison de ses effets sur l'insulinorésistance dans le muscle squelettique ([Lan et al., 2014](#)) et le tissu adipeux ([Jung et al., 2018](#)). En accord avec ces données, nous avons mis en évidence dans une cohorte de patients obèses avec ou sans stéatose une corrélation entre l'augmentation de l'expression hépatique de LECT2 et l'indice *homeostatic model assessment of insulin resistance* (HOMA-IR). Or, dans notre modèle murin, que ce soit sous régime standard ou HFD, les souris *Lect2*^{-/-} présentent le même niveau d'insulinorésistance que les souris contrôle, malgré une forte expression de LECT2 dans ces dernières dans la condition de régime. Toutefois, ces résultats se limitent à un test de tolérance à l'insuline ou au glucose, et nécessitent un approfondissement moléculaire, notamment une quantification de l'insuline circulante et une évaluation des niveaux de phosphorylation des différents acteurs de la signalisation insuline. Ces analyses permettront également de renforcer les effets spécifiques de LECT2 sur la régulation de la lipogenèse, puisque SREBP1c peut également être activé par un signal insuline ([Foretz et al., 1999](#); [Shimomura et al., 1999](#)). Afin de confirmer nos résultats, il est également important d'utiliser notre construction AAV8-*Lect2* afin d'évaluer les effets de la surexpression de LECT2, aussi bien en physiologie que sous HFD. Enfin, il serait pertinent d'établir un modèle inductible de LECT2 afin de contrôler son expression ou sa délétion en fonction des conditions expérimentales.

De plus, les mécanismes précis qui induisent l'expression de LECT2 sont toujours inconnus. Il est possible que LECT2 soit exprimé en réponse au *sensing* de certaines espèces lipidiques par les hépatocytes, ou en réponse à un déséquilibre énergétique.

B) LECT2 et régulation du métabolisme du cholestérol

L'analyse du contenu lipidique des foies contrôle et *Lect2*^{-/-} sous HFD a révélé une diminution de la quantité de cholestérol total et estérifié dans les souris *Lect2*^{-/-}. Or, des analyses *RNAseq* montrent un enrichissement en gènes impliqués dans sa biosynthèse, indiquant qu'un déséquilibre vers l'export à travers les acides biliaires est survenu dans ces souris. Cet export accru peut s'expliquer par une augmentation de l'expression des gènes participant à la conversion en acides biliaires (*Cyp7a1*) et à leur excrétion (*Abcb4*, *Abcb11*), qui sont des cibles de LXR. De plus, *Nfe2L1*, un senseur de l'homéostasie du cholestérol qui participe à son export dans les acides biliaires (*Akl et al., 2023; Widenmaier et al., 2017*) est également induit. Il est donc indispensable dans un premier temps de quantifier les acides biliaires et leur teneur en cholestérol, ainsi que d'évaluer au niveau protéique la présence de NFE2L1 clivé dans le noyau. De plus, il est nécessaire de déterminer si l'induction de la synthèse du cholestérol se fait en réponse à une dérégulation de l'export, ou si la synthèse excessive provoque un export accru. Nous avons un élément de réponse grâce à notre modèle de régime enrichi en cholestérol. Dans ces conditions, LECT2 n'est pas induit dans les souris contrôles, soulignant le lien étroit entre expression de LECT2 et concentration de cholestérol hépatique. Le surplus de cholestérol provoque une augmentation de l'expression des transporteurs de cholestérol libre *Abcg5* et *Abcg8* dans les deux groupes, et de *Cyp7a1* seulement dans le groupe contrôle, mais l'expression d'*Abcb4* et *Abcb11* reste équivalente dans les deux groupes sous régime standard et HFHC (Figure 33A). Notre signature *RNAseq* montre toutefois une diminution de l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme des acides biliaires dans les souris *Lect2*^{-/-} (Figure 33B), suggérant une incapacité de ces souris à réguler ce surplus de cholestérol, et la possibilité pour les acides biliaires de s'accumuler dans le tissu et participer aux lésions hépatiques. Il est donc possible que LECT2 intervienne particulièrement dans la régulation de l'export du cholestérol dans les acides biliaires via LXR, et que la signature de synthèse observée en physiologie et sous HFD soit une tentative d'équilibrer les niveaux de cholestérol intracellulaires. Une autre possibilité est que LECT2 et NFE2L1 pourraient interagir afin d'inhiber l'export de cholestérol médié par LXR (Figure 34), mais cela constitue à lui seul un projet de recherche à part entière.

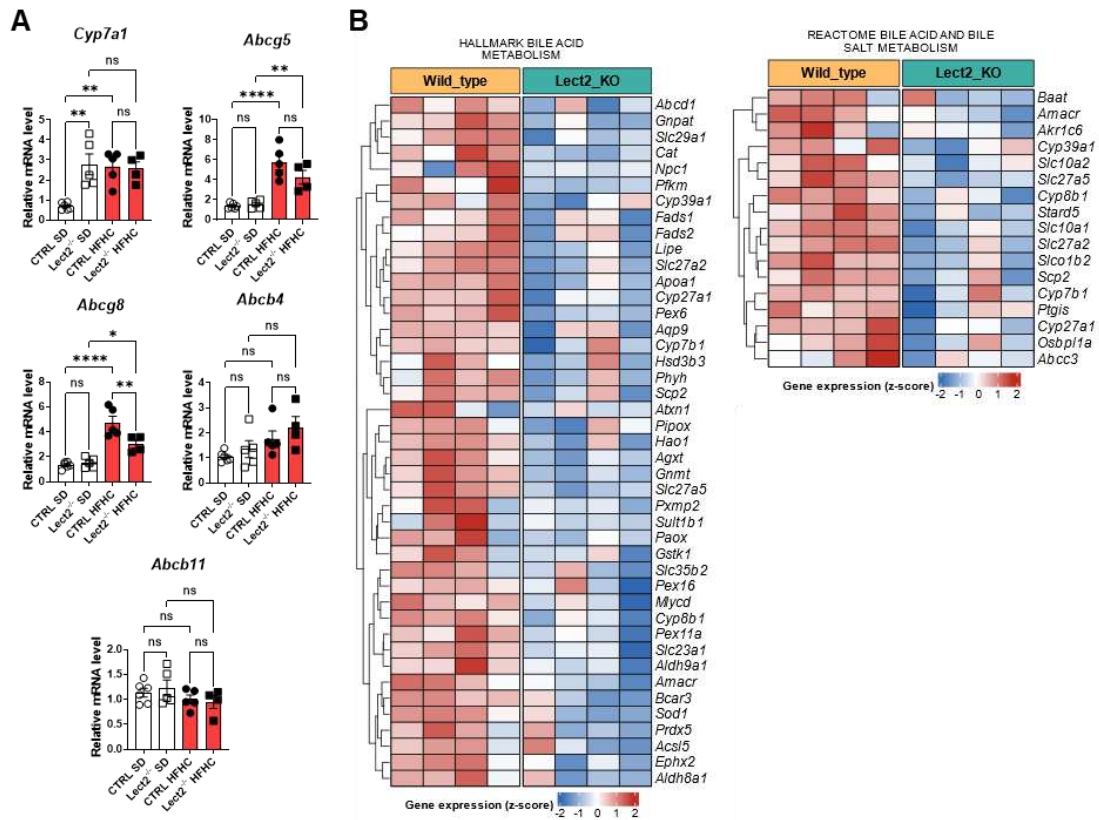


Figure 33. LECT2 participe à l'homéostasie de l'export des acides biliaires sous HFD.

(A) Expression des gènes impliqués dans le transport de cholestérol et la synthèse et l'export d'acides biliaires dans les foies de souris contrôle et *Lect2*^{-/-} sous HFHC pendant 6 mois. Ns *p*-value > 0,05 ; * *p*-value < 0,05 ; ** *p*-value < 0,01 ; **** *p*-value < 0,0001 (one-way Anova suivi d'une comparaison multiple de Šidák). (B) Heatmap représentative d'une analyse GSEA de gènes impliqués dans le métabolisme des acides biliaires à partir des bases de données Hallmark et C2:Reactome.

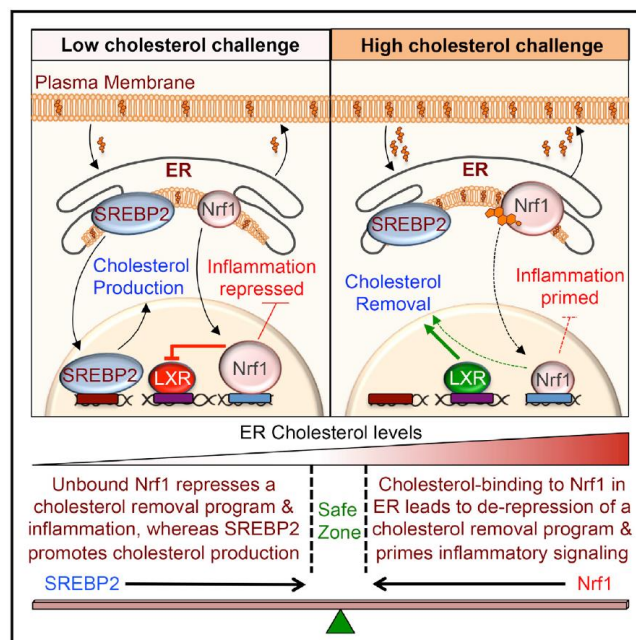


Figure 34. Mécanisme proposé pour la régulation de la synthèse du cholestérol par Nfe2L1.

D'après Widenmaier et al., 2017.

C) LECT2 et fonction mitochondriale

L'excès et la déplétion en cholestérol observés dans les souris *Lect2^{-/-}* respectivement sous régime HFHC et HFD sont concomitants à une diminution de la fonction mitochondriale. Or, on retrouve parmi les *hallmarks* des NAFLD une altération des mitochondries ([Fromenty and Roden, 2023](#)). Dans notre contexte, nous avons montré une signature transcriptionnelle négative des gènes impliqués dans l'assemblage des complexes mitochondriaux, associée à une diminution des capacités respiratoires et de la production d'ATP spécifique à la condition de régime HFD dans les souris *Lect2^{-/-}*. Ce défaut de transport d'électrons pourrait avoir comme origine l'augmentation des ROS dans les hépatocytes, mais également une altération de la fluidité des membranes mitochondriales provoquée par la déplétion en cholestérol. Nous avons mis en évidence une induction de l'expression de *Hmox1*, *Nqo1*, *HBa1*, *GPX3*, et *GSTM3*, ainsi que des facteurs de transcription *Nfe2L1* et *Nfe2L2* qui régulent la réponse antioxydante, avec une expression significativement plus élevée dans les souris *Lect2^{-/-}* sous HFD. De plus, *Nfe2L* et *Nfe2L2* régulent également l'expression de certaines protéines constituant les complexes mitochondriaux ([Scarpulla, 2012](#)). Nous n'avons toutefois pas quantifié les ROS au cours de nos travaux, et il est crucial de le faire pour la suite. Bien que nous n'ayons pas de perte de mitochondries en absence de LECT2, il serait intéressant d'évaluer leur forme par microscopie électronique. En effet, le cholestérol est un constituant essentiel des membranes cellulaires, et permet de réguler leur fluidité. Le défaut de transport d'électrons peut également être causé par une perte de stabilité des complexes en raison de la composition membranaire. Dans la condition de surcharge en cholestérol, la composition en phospholipides est probablement à l'origine de la perte de fonction mitochondriale, avec un ratio phosphatidylcholine/phosphatidyléthanolamine plus faible dans les foies *Lect2^{-/-}*, ce qui est un marqueur d'altération mitochondriale ([Van Der Veen et al., 2014](#)). Nous devons toutefois caractériser les capacités respiratoires dans ces conditions par *Seahorse* sur des hépatocytes primaires, et quantifier les ROS produites. De plus, nous devons également explorer les conséquences de cette altération mitochondriale sur les autres voies métaboliques, notamment le métabolisme du glucose. Il serait donc nécessaire de réaliser une analyse dynamique des flux métaboliques dans des conditions physiologiques et sous HFD dans des hépatocytes primaires contrôle et *Lect2^{-/-}*.

D) LECT2 et lipotoxicité

Un autre *hallmark* des NAFLD est l'accumulation de triglycérides dans les hépatocytes ([Friedman et al., 2018](#)), dont les acides gras proviennent de la lipolyse du tissu adipeux, de l'alimentation, et jusqu'à 25% sont générés par la lipogenèse *de novo* ([Donnelly et al., 2005](#)). Il a été proposé que la lipogenèse soit plutôt un mécanisme de protection qui permettrait de stocker des acides gras peu toxiques sous forme inerte de triglycérides ([Lodhi et al., 2011](#)), et de nombreuses études ont démontré un effet protecteur de la stéatose ([Benhamed et al., 2012](#); [Bril et al., 2017](#); [Matsuzaka et al., 2007](#); [Monetti et al., 2007](#); [Yamaguchi et al., 2007](#)). D'autre part, l'accumulation de lipides toxiques tels que le cholestérol non-estérifié, les diacylglycérols ou les céramides provoque des dommages cellulaires au niveau du parenchyme hépatique ([Marra and Svegliati-Baroni, 2018](#)). Puisque LXR intervient à la fois dans la lipogenèse et l'homéostasie du cholestérol, il est un gardien de l'équilibre entre lipotoxicité et lipoprotection, et a été décrit comme ayant un rôle protecteur dans la NASH ([Becares et al., 2019](#); [Wouters et al., 2010](#)). D'après nos résultats en conditions physiologiques, LECT2 régule l'activité de LXR, et LECT2 est induit dans les foies stéatosiques, aussi bien chez les patients que chez la souris. En conditions de stéatose induite par le HFD, nous n'avons pas observé de différence en termes de lipides toxiques entre les souris contrôle et *Lect2^{-/-}* en dehors d'une accumulation d'hexosylcéramides dans le groupe *Lect2^{-/-}*. L'implication de ces lipides dans les NAFLD est encore très peu étudiée. Cependant, sous régime HFHC, les foies *Lect2^{-/-}* sont enrichis en de nombreuses espèces de diacylglycérols et de céramides, et notre analyse histologique et moléculaire révèle une forte inflammation et de la fibrose qui causent des dommages tissulaires plus importants que dans les foies contrôle. De plus, les concentrations en cholestérol libre et estérifié sont similaires entre les deux groupes (Figure 35), donc dans un contexte de surcharge en cholestérol, la lipotoxicité semble être majoritairement causée par les céramides et les diacylglycérols dans le groupe déficient en LECT2. Il est toutefois important de quantifier les oxystérols, car certains, dont le 25-OHC, peuvent provoquer un stress du RE et induire l'apoptose dans les macrophages ([Sekiya et al., 2014](#)) et dans les lignées HepG2 et HuH7 ([Li et al., 2016](#)). Il est donc nécessaire d'investiguer les niveaux d'activation du stress du RE dans nos conditions, particulièrement la voie IRE1 α qui intervient dans l'inflammation ([Lebeaupin et al., 2018](#))

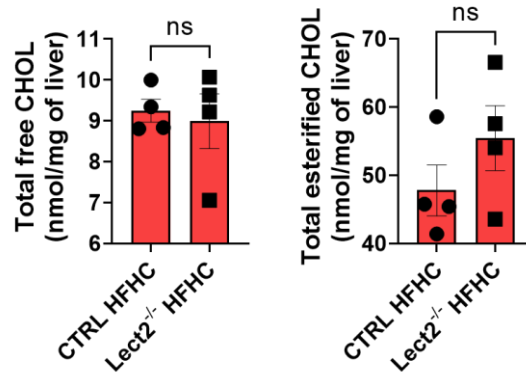


Figure 35. Quantification du cholestérol libre et estérifié dans les foies de souris contrôle et *Lect2*^{-/-} après 6 mois de régime HFHC.

Ns p-value > 0,05.

E) LECT2 et inflammation

L'apparition de l'inflammation et son installation chronique dans le foie est une étape de transition de la stéatose vers la NASH (*Friedman et al., 2018*). Plusieurs catégories de cellules immunitaires ont été impliquées dans la NASH, notamment les NKT qui, via la sécrétion de la cytokine LIGHT, favorisent le stockage de lipides dans les hépatocytes (*Wolf et al., 2014*), et leur accumulation hépatique est corrélée avec la sévérité de la NASH (*Syn et al., 2010*). Or, LECT2 est un régulateur de l'homéostasie des NKT dans le foie, puisque les souris *Lect2*^{-/-} possèdent deux fois plus de NKT que les souris contrôles, ce qui les rend plus susceptibles aux dommages provoqués par des hépatites fulminantes (*Saito et al., 2004*). De plus, notre équipe a démontré que LECT2 était essentiel à la mise en place d'une réponse antitumorale efficace des NKT (*Anson et al., 2012*) et des macrophages (*L'Hermitte et al., 2019*). Au vu de nos résultats montrant une action régulatrice de LECT2 sur LXR, nous ne pouvons pas affirmer avec certitude que ses effets sont seulement limités aux hépatocytes. En effet, LXR est également un régulateur important pour l'activité anti-inflammatoire des macrophages, où il inhibe la signalisation TLR-dépendante et limite la sécrétion d'IL-1 β et d'IL-6 (*Ito et al., 2015*). L'invalidation de LXR provoque une NASH aggravée, une accumulation de macrophages inflammatoires et une perte de iNKT (*Endo-Umeda et al., 2018b*). Dans la NASH, les cellules de Kupffer sont déplétées et sont remplacées par des monocytes qui acquièrent un programme transcriptionnel spécifique (*Tran et al., 2020*). En partenariat avec d'autres facteurs, LXR participe à la transcription d'un certain nombre de gènes constituant cette identité Kupffer, et son activité est favorisée par le desmostérol sécrété par les hépatocytes (*Sakai et al., 2019*). En induisant la NASH avec un régime enrichi en cholestérol,

l'activité de LXR est maintenue sur ses cibles canoniques du métabolisme du cholestérol, mais pas sur les gènes de l'identité Kupffer (*Seidman et al., 2020*). Par ailleurs, il a été montré dans un modèle *ex vivo* de *bone marrow-derived macrophages* (BMDM) stimulées avec du LPS que la production d'interféron de type I favorise l'expression de la Ch25H et la synthèse de 25-OHC. Ce dernier, par sa liaison avec INSIG, prévient le clivage de SREBP2 et empêche l'altération des mitochondries et le clivage de l'IL-1 β (*Dang et al., 2017; Reboldi et al., 2014*). De plus, la stimulation de macrophages alvéolaires avec du LPS inhalé conduit à une synthèse accrue de 25-OHC, qui active LXR et participe à la résolution de l'inflammation (*Madenspacher et al., 2020*). Nous pouvons alors supposer que l'activation aberrante de LXR dans les macrophages chez les souris *Lect2*^{-/-} pourrait empêcher une mise en place d'une réponse immunitaire efficace contre la lipotoxicité. Nous avons des résultats préliminaires qui permettent d'étayer cette hypothèse, puisqu'après trois mois de régime HFHC, les parenchymes hépatiques des deux génotypes présentent des infiltrats immunitaires étendus, cependant ils ne sont pas organisés de la même manière, et une signature transcriptionnelle inflammatoire montre une expression plus limitée de marqueurs inflammatoires dans les foies *Lect2*^{-/-} (Figure 36). Cela suggère un retard de la mise en place de la réponse inflammatoire, qui se traduit après 6 mois de régime avec des lésions tissulaires plus graves, et une réponse inflammatoire exacerbée. Ainsi, la surcharge en cholestérol a permis de mettre en avant le rôle dual de LECT2 en tant qu'acteur du métabolisme et de la régulation de la réponse inflammatoire. Il serait intéressant pour la suite dans un premier temps de quantifier et d'analyser par *single cell* RNAseq les différentes populations immunitaires dans nos deux groupes sous régime, puis d'isoler les macrophages et les NKT, et d'évaluer leur potentiel inflammatoire d'une part, et l'activité de LXR de ces cellules d'autre part.

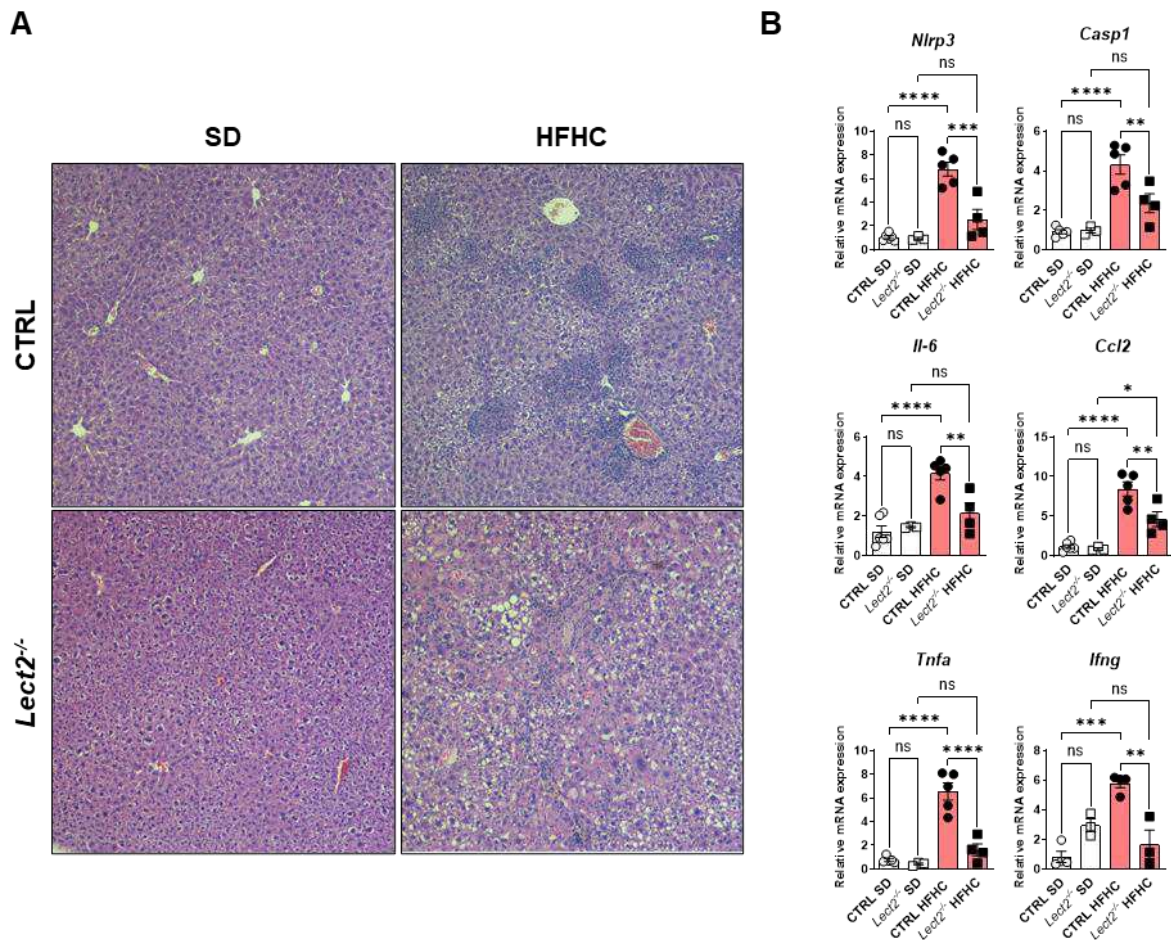


Figure 36. La délétion de Lect2 altère la réponse inflammatoire dans les étapes précoces de la NASH provoquée par une surcharge en cholestérol.

(A) Coupes histologiques (coloration hémalum et éosine) représentatives de parenchymes hépatiques provenant de souris contrôle et *Lect2*^{-/-} sous régime standard ou HFHC pendant 3 mois. (B) Expression des gènes impliqués dans réponse inflammatoire dans les foies de souris contrôle et *Lect2*^{-/-} sous HFHC pendant 3 mois. Ns *p*-value > 0,05 ; * *p*-value < 0,05 ; ** *p*-value < 0,01 ; *** *p*-value < 0,001 ; **** *p*-value < 0,0001 (one-way Anova suivi d'une comparaison multiple de Šidák).

F) LECT2 et tumorigénèse hépatique

Les travaux antérieurs du laboratoire portant sur le rôle de LECT2 dans la carcinogénèse hépatique dépendante de l'activation de la β -caténine ont montré qu'en absence de LECT2, le microenvironnement inflammatoire est modifié vers un profil pro-tumoral. Ainsi, les NKT et macrophages perdent leur capacité antitumorale, ce qui favorise la transition épithélio-mésenchymateuse des hépatocytes tumoraux et facilite leur propagation sous forme de métastases pulmonaires (Anson *et al.*, 2012; L'Hermitte *et al.*, 2019). De plus, dans une cohorte de patients avec différentes étiologies de CHC, l'expression de *Lect2* est d'autant plus faible que le phénotype des tumeurs est grave. Ainsi, les groupes correspondant à des mutations

TP53 ont une perte d'expression de *Lect2* plus importante que les groupes présentant des mutations de *Cttnb1* (*L'Hermitte et al., 2019*). Cependant, nous avons voulu étudier les conséquences à long terme de l'absence de LECT2 dans un contexte métabolique, et nous avons placé nos animaux sous un régime CD-HFD récapitulant la séquence des NAFLD jusqu'au développement tumoral. Ce régime est connu pour engendrer des tumeurs dans environ 20% des cas chez des souris contrôle au bout de 12 mois (*Wolf et al., 2014*), et dans notre cas nous avons mesuré un taux d'incidence de 17%. Cependant, l'ensemble des animaux *Lect2*^{-/-} ont développé des tumeurs après 12 mois de régime, mais ces tumeurs se développent précocement dès 9 mois de régime dans 60% des cas pour les souris *Lect2*^{-/-}. Notre caractérisation histologique et moléculaire a mis en évidence un phénotype tumoral aggravé dans les souris *Lect2*^{-/-}. La caractérisation anatomopathologique des nodules est en cours afin de déterminer la proportion d'adénomes et de carcinomes. Bien que très préliminaires mais en association avec nos travaux précédents, nos résultats mettent une nouvelle fois en évidence les propriétés suppresseur de tumeur de LECT2. Il serait intéressant par ailleurs de caractériser les propriétés métaboliques et le microenvironnement immunitaire de ces tumeurs, mais également de comparer les effets d'une surexpression de LECT2 et un sauvetage durant la séquence NAFL/NASH/CHC afin de déterminer la capacité de LECT2 à prévenir du développement tumoral.

III. LECT2 en tant que biomarqueur pour les NAFLD

Nous avons évalué l'expression hépatique de LECT2 chez des patients avec et sans stéatose et avons mis en évidence une augmentation de son expression chez les patients stéatosiques. Ces résultats sont également vrais dans plusieurs modèles murins de stéatose et NASH. Chez les patients, l'augmentation de l'expression de LECT2 est positivement corrélée avec différents paramètres biologiques permettant de qualifier la progression pathologique (*NAFLD activity score*, transaminases sériques, score de stéatose). D'autre part, l'expression de LECT2 a été corrélée avec le score de fibrose chez les patients de diverses étiologies, et une augmentation de la quantité de LECT2 est associée à une fibrose plus étendue, voire de la cirrhose (*Xu et al., 2019*). Enfin, comme évoqué précédemment, LECT2 est perdu dans la tumorigénèse chez l'Homme (*L'Hermitte et al., 2019*). Il serait donc intéressant de déterminer le statut de LECT2 dans le foie tumoral et non-tumoral adjacent dans une cohorte de patients ayant développé un CHC sous fond NASH à différents degrés de fibrose. Nous sommes actuellement en train de constituer une cohorte en collaboration avec le Professeur

Valérie Paradis afin de réaliser ces analyses. De plus, nous devons compléter nos résultats par une quantification de la protéine LECT2 dans le sérum des patients, puisque la quantification de la transcription n'est pas toujours suffisante pour évaluer les niveaux protéiques. Ainsi, il serait possible de déterminer une cinétique de l'expression de LECT2 tout au long de cette pathologie. Pour aller plus loin, il serait intéressant d'associer ces résultats à une étude du microenvironnement, notamment des populations immunitaires impliquées, en les mettant en évidence dans le tissu par des techniques de co-marquages de pointe, et en comparant leur potentiel inflammatoire à l'aide de la transcriptomique *in situ*. D'autre part, nous explorerons le contenu lipidique au cours de la séquence afin de corrélérer les flux de différents acides gras avec les niveaux d'expression de LECT2. Ainsi, il sera possible de déterminer très précisément si LECT2 pourrait constituer un biomarqueur clinique.

IV. Conclusion

Ces travaux de thèse ont mis en évidence le rôle de LECT2 dans la régulation du métabolisme lipidique du foie par son action sur LXR/SREBP1c en conditions physiologiques. Dans les NAFLD, LECT2 est nécessaire pour le maintien de l'homéostasie du métabolisme du cholestérol, ce qui confère un maintien de l'intégrité mitochondriale, et permet de garantir une réponse immunitaire efficace. De plus, étant donné son induction chez les patients NAFLD, LECT2 pourrait constituer un biomarqueur pertinent pour le diagnostic et le suivi des patients. La suite de ce projet permettra de mieux comprendre le fonctionnement moléculaire de LECT2 et son utilité clinique dans l'évaluation des NAFLD.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

- Abdel-Misih, S.R.Z., Bloomston, M., 2010. Liver Anatomy. *Surg. Clin. North Am.* 90, 643–653. <https://doi.org/10.1016/j.suc.2010.04.017>
- Abu-Elheiga, L., Matzuk, M.M., Abo-Hashema, K.A.H., Wakil, S.J., 2001. Continuous Fatty Acid Oxidation and Reduced Fat Storage in Mice Lacking Acetyl-CoA Carboxylase 2. *Science* 291, 2613–2616. <https://doi.org/10.1126/science.1056843>
- Abu-Elheiga, L., Oh, W., Kordari, P., Wakil, S.J., 2003. Acetyl-CoA carboxylase 2 mutant mice are protected against obesity and diabetes induced by high-fat/high-carbohydrate diets. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100, 10207–10212. <https://doi.org/10.1073/pnas.1733877100>
- Adams, C.M., Reitz, J., De Brabander, J.K., Feramisco, J.D., Li, L., Brown, M.S., Goldstein, J.L., 2004. Cholesterol and 25-Hydroxycholesterol Inhibit Activation of SREBPs by Different Mechanisms, Both Involving SCAP and Insigs. *J. Biol. Chem.* 279, 52772–52780. <https://doi.org/10.1074/jbc.M410302200>
- Agius, L., 2008. Glucokinase and molecular aspects of liver glycogen metabolism. *Biochem. J.* 414, 1–18. <https://doi.org/10.1042/BJ20080595>
- Aguirre, V., Uchida, T., Yenush, L., Davis, R., White, M.F., 2000. The c-Jun NH2-terminal Kinase Promotes Insulin Resistance during Association with Insulin Receptor Substrate-1 and Phosphorylation of Ser307. *J. Biol. Chem.* 275, 9047–9054. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.12.9047>
- Ahn, S.B., Jang, K., Jun, D.W., Lee, B.H., Shin, K.J., 2014. Expression of Liver X Receptor Correlates with Intrahepatic Inflammation and Fibrosis in Patients with Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Dig. Dis. Sci.* 59, 2975–2982. <https://doi.org/10.1007/s10620-014-3289-x>
- Akl, M.G., Li, L., Baccetto, R., Phanse, S., Zhang, Q., Trites, M.J., McDonald, S., Aoki, H., Babu, M., Widenmaier, S.B., 2023. Complementary gene regulation by NRF1 and NRF2 protects against hepatic cholesterol overload. *Cell Rep.* 42, 112399. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2023.112399>
- ALJohani, A.M., Syed, D.N., Ntambi, J.M., 2017. Insights into Stearoyl-CoA Desaturase-1 Regulation of Systemic Metabolism. *Trends Endocrinol. Metab.* 28, 831–842. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2017.10.003>
- Alves-Bezerra, M., Cohen, D.E., 2017. Triglyceride Metabolism in the Liver, in: Terjung, R. (Ed.), *Comprehensive Physiology*. Wiley, pp. 1–22. <https://doi.org/10.1002/cphy.c170012>
- Amemiya-Kudo, M., Shimano, H., Yoshikawa, T., Yahagi, N., Hasty, A.H., Okazaki, H., Tamura, Y., Shionoiri, F., Iizuka, Y., Ohashi, K., Osuga, J., Harada, K., Gotoda, T., Sato, R., Kimura, S., Ishibashi, S., Yamada, N., 2000. Promoter Analysis of the Mouse Sterol Regulatory Element-binding Protein-1c Gene. *J. Biol. Chem.* 275, 31078–31085. <https://doi.org/10.1074/jbc.M005353200>
- Amer, J., Salhab, A., Nouredin, M., Doron, S., Abu-Tair, L., Ghantous, R., Mahamid, M., Safadi, R., 2018. Insulin signaling as a potential natural killer cell checkpoint in fatty liver disease. *Hepatol. Commun.* 2, 285–298. <https://doi.org/10.1002/hep4.1146>
- Anson, M., Crain-Denoyelle, A.-M., Baud, V., Chereau, F., Gougelet, A., Terris, B., Yamagoe, S., Colnot, S., Viguier, M., Perret, C., Couty, J.-P., 2012. Oncogenic β -catenin triggers an inflammatory response that determines the aggressiveness of hepatocellular carcinoma in mice. *J. Clin. Invest.* 122, 586–599. <https://doi.org/10.1172/JCI43937>

- Anstee, Q.M., Reeves, H.L., Kotsiliti, E., Govaere, O., Heikenwalder, M., 2019. From NASH to HCC: current concepts and future challenges. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 16, 411–428. <https://doi.org/10.1038/s41575-019-0145-7>
- Anstee, Q.M., Targher, G., Day, C.P., 2013. Progression of NAFLD to diabetes mellitus, cardiovascular disease or cirrhosis. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 10, 330–344. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2013.41>
- Apfel, R., Benbrook, D., Salbert, G., Pfahl, A.M., 1994. A Novel Orphan Receptor Specific for a Subset of Thyroid Hormone-Responsive Elements and Its Interaction with the Retinoid/Thyroid Hormone Receptor Subfamily. *MOL CELL BIOL* 14.
- Ariyama, H., Kono, N., Matsuda, S., Inoue, T., Arai, H., 2010. Decrease in Membrane Phospholipid Unsaturation Induces Unfolded Protein Response. *J. Biol. Chem.* 285, 22027–22035. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.126870>
- Arkan, M.C., Hevener, A.L., Greten, F.R., Maeda, S., Li, Z.-W., Long, J.M., Wynshaw-Boris, A., Poli, G., Olefsky, J., Karin, M., 2005. IKK- β links inflammation to obesity-induced insulin resistance. *Nat. Med.* 11, 191–198. <https://doi.org/10.1038/nm1185>
- Arruda, A.P., Pers, B.M., Parlakg ul, G., G neay, E., Inouye, K., Hotamisligil, G.S., 2014. Chronic enrichment of hepatic endoplasmic reticulum–mitochondria contact leads to mitochondrial dysfunction in obesity. *Nat. Med.* 20, 1427–1435. <https://doi.org/10.1038/nm.3735>
- Ascha, M.S., Hanouneh, I.A., Lopez, R., Tamimi, T.A.-R., Feldstein, A.F., Zein, N.N., 2010. The incidence and risk factors of hepatocellular carcinoma in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 51, 1972–1978. <https://doi.org/10.1002/hep.23527>
- Auberger, P., Falquerho, L., Contreres, J.O., Pages, G., Le Cam, G., Rossi, B., Le Cam, A., 1989. Characterization of a natural inhibitor of the insulin receptor tyrosine kinase: cDNA cloning, purification, and anti-mitogenic activity. *Cell* 58, 631–640. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(89\)90098-6](https://doi.org/10.1016/0092-8674(89)90098-6)
- Badman, M.K., Pissios, P., Kennedy, A.R., Koukos, G., Flier, J.S., Maratos-Flier, E., 2007. Hepatic Fibroblast Growth Factor 21 Is Regulated by PPAR α and Is a Key Mediator of Hepatic Lipid Metabolism in Ketotic States. *Cell Metab.* 5, 426–437. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2007.05.002>
- Baeck, C., Wehr, A., Karlmark, K.R., Heymann, F., Vucur, M., Gassler, N., Huss, S., Klussmann, S., Eulberg, D., Luedde, T., Trautwein, C., Tacke, F., 2012. Pharmacological inhibition of the chemokine CCL2 (MCP-1) diminishes liver macrophage infiltration and steatohepatitis in chronic hepatic injury. *Gut* 61, 416–426. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2011-300304>
- Bailly-Maitre, B., Belgardt, B.F., Jordan, S.D., Coornaert, B., John Von Freyend, M., Kleinridders, A., Mauer, J., Cuddy, M., Kress, C.L., Willmes, D., Essig, M., Hampel, B., Protzer, U., Reed, J.C., Br uning, J.C., 2010. Hepatic Bax Inhibitor-1 Inhibits IRE1 α and Protects from Obesity-associated Insulin Resistance and Glucose Intolerance. *J. Biol. Chem.* 285, 6198–6207. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.056648>
- Barlowe, C., Orci, L., Yeung, T., Hosobuchi, M., Hamamoto, S., Salama, N., Rexach, M.F., Ravazzola, M., Amherdt, M., Schekman, R., 1994. COPII: A Membrane Coat Formed by Set Proteins That Drive Vesicle Budding from the Endoplasmic Reticulum. *Cell* 77, 895–908.
- Bauman, D.R., Bitmansour, A.D., McDonald, J.G., Thompson, B.M., Liang, G., Russell, D.W., 2009. 25-Hydroxycholesterol secreted by macrophages in response to Toll-like receptor activation suppresses immunoglobulin A production. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106, 16764–16769. <https://doi.org/10.1073/pnas.0909142106>
- Becares, N., Gage, M.C., Voisin, M., Shrestha, E., Martin-Gutierrez, L., Liang, N., Louie, R., Pourcet, B., Pello, O.M., Luong, T.V., Go ni, S., Pichardo-Almarza, C., R oberg-Larsen, H., Diaz-Zuccarini, V., Steffensen, K.R., O’Brien, A., Garabedian, M.J., Rombouts, K.,

- Treuter, E., Pineda-Torra, I., 2019. Impaired LXR α Phosphorylation Attenuates Progression of Fatty Liver Disease. *Cell Rep.* 26, 984-995.e6. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.12.094>
- Bechmann, L.P., Hannivoort, R.A., Gerken, G., Hotamisligil, G.S., Trauner, M., Canbay, A., 2012. The interaction of hepatic lipid and glucose metabolism in liver diseases. *J. Hepatol.* 56, 952–964. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2011.08.025>
- Behari, J., Li, H., Liu, S., Stefanovic-Racic, M., Alonso, L., O'Donnell, C.P., Shiva, S., Singamsetty, S., Watanabe, Y., Singh, V.P., Liu, Q., 2014. β -Catenin Links Hepatic Metabolic Zonation with Lipid Metabolism and Diet-Induced Obesity in Mice. *Am. J. Pathol.* 184, 3284–3298. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2014.08.022>
- Ben-Aicha, S., Badimon, L., Vilahur, G., 2020. Advances in HDL: Much More than Lipid Transporters. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 732. <https://doi.org/10.3390/ijms21030732>
- Bengochea-Alonso, M.T., Ericsson, J., 2009. A Phosphorylation Cascade Controls the Degradation of Active SREBP1. *J. Biol. Chem.* 284, 5885–5895. <https://doi.org/10.1074/jbc.M807906200>
- Benhamed, F., Denechaud, P.-D., Lemoine, M., Robichon, C., Moldes, M., Bertrand-Michel, J., Ratzu, V., Serfaty, L., Housset, C., Capeau, J., Girard, J., Guillou, H., Postic, C., 2012. The lipogenic transcription factor ChREBP dissociates hepatic steatosis from insulin resistance in mice and humans. *J. Clin. Invest.* 122, 2176–2194. <https://doi.org/10.1172/JCI41636>
- Benhamouche, S., Decaens, T., Godard, C., Chambrey, R., Rickman, D.S., Moinard, C., Vasseur-Cognet, M., Kuo, C.J., Kahn, A., Perret, C., Colnot, S., 2006. Apc Tumor Suppressor Gene Is the “Zonation-Keeper” of Mouse Liver. *Dev. Cell* 10, 759–770. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2006.03.015>
- Berthou, F., Sobolewski, C., Abegg, D., Fournier, M., Maeder, C., Dolicka, D., Correia de Sousa, M., Adibekian, A., Foti, M., 2022. Hepatic PTEN Signaling Regulates Systemic Metabolic Homeostasis through Hepatokines-Mediated Liver-to-Peripheral Organs Crosstalk. *Int. J. Mol. Sci.* 23, 3959. <https://doi.org/10.3390/ijms23073959>
- Bielska, A.A., Schlesinger, P., Covey, D.F., Ory, D.S., 2012. Oxysterols as non-genomic regulators of cholesterol homeostasis. *Trends Endocrinol. Metab.* 23, 99–106. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2011.12.002>
- Bikman, B.T., Guan, Y., Shui, G., Siddique, M.M., Holland, W.L., Kim, J.Y., Fabriàs, G., Wenk, M.R., Summers, S.A., 2012. Fenretinide Prevents Lipid-induced Insulin Resistance by Blocking Ceramide Biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 287, 17426–17437. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.359950>
- Bilimoria, J., Singh, H., 2019. The Angiotensin II receptors and Tie receptors: potential diagnostic biomarkers of vascular disease. *J. Recept. Signal Transduct.* 39, 187–193. <https://doi.org/10.1080/10799893.2019.1652650>
- Blanco, A., Blanco, G., 2017a. Chapter 5 - Lipids, in: *Medical Biochemistry*. Elsevier Inc., pp. 99–119.
- Blanco, A., Blanco, G., 2017b. Chapter 15 - Lipid Metabolism, in: *Medical Biochemistry*. Elsevier Inc., pp. 325–365.
- Bonnardel, J., T'Jonck, W., Gaublonne, D., Browaeys, R., Scott, C.L., Martens, L., Vanneste, B., De Prijck, S., Nedospasov, S.A., Kremer, A., Van Hamme, E., Borghgraef, P., Toussaint, W., De Bleser, P., Mannaerts, I., Beschin, A., van Grunsven, L.A., Lambrecht, B.N., Taghon, T., Lippens, S., Elewaut, D., Saeys, Y., Williams, M., 2019. Stellate Cells, Hepatocytes, and Endothelial Cells Imprint the Kupffer Cell Identity on Monocytes Colonizing the Liver Macrophage Niche. *Immunity* 51, 638-654.e9. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.08.017>
- Boursier, J., Mueller, O., Barret, M., Machado, M., Fizanne, L., Araujo-Perez, F., Guy, C.D., Seed, P.C., Rawls, J.F., David, L.A., Hunault, G., Oberti, F., Calès, P., Diehl, A.M., 2016.

- The severity of nonalcoholic fatty liver disease is associated with gut dysbiosis and shift in the metabolic function of the gut microbiota. *Hepatology* 63, 764–775. <https://doi.org/10.1002/hep.28356>
- Breuer, D.A., Pacheco, M.C., Washington, M.K., Montgomery, S.A., Hasty, A.H., Kennedy, A.J., 2020. CD8+ T cells regulate liver injury in obesity-related nonalcoholic fatty liver disease. *Am. J. Physiol.-Gastrointest. Liver Physiol.* 318, G211–G224. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00040.2019>
- Bril, F., Barb, D., Portillo-Sanchez, P., Biernacki, D., Lomonaco, R., Suman, A., Weber, M.H., Budd, J.T., Lupi, M.E., Cusi, K., 2017. Metabolic and histological implications of intrahepatic triglyceride content in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 65, 1132–1144. <https://doi.org/10.1002/hep.28985>
- Bronner, M., Hertz, R., Bar-Tana, J., 2004. Kinase-independent transcriptional co-activation of peroxisome proliferator-activated receptor α by AMP-activated protein kinase. *Biochem. J.* 384, 295–305. <https://doi.org/10.1042/BJ20040955>
- Brown, M.S., Goldstein, J.L., 2009. Cholesterol feedback: from Schoenheimer's bottle to Scap's MELADL. *J. Lipid Res.* 50, S15–S27. <https://doi.org/10.1194/jlr.R800054-JLR200>
- Buzzetti, E., Pinzani, M., Tsochatzis, E.A., 2016. The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Metabolism* 65, 1038–1048. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2015.12.012>
- Byrne, C.D., Targher, G., 2020. NAFLD as a driver of chronic kidney disease. *J. Hepatol.* 72, 785–801. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2020.01.013>
- Caballero, F., Fernández, A., De Lacy, A.M., Fernández-Checa, J.C., Caballería, J., García-Ruiz, C., 2009. Enhanced free cholesterol, SREBP-2 and StAR expression in human NASH. *J. Hepatol.* 50, 789–796. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2008.12.016>
- Cai, C., Zhu, X., Li, P., Li, J., Gong, J., Shen, W., He, K., 2017. NLRP3 Deletion Inhibits the Non-alcoholic Steatohepatitis Development and Inflammation in Kupffer Cells Induced by Palmitic Acid. *Inflammation* 40, 1875–1883. <https://doi.org/10.1007/s10753-017-0628-z>
- Calvo, M., Tebar, F., Lopez-Iglesias, C., Enrich, C., 2001. Morphologic and functional characterization of caveolae in rat liver hepatocytes. *Hepatology* 33, 1259–1269. <https://doi.org/10.1053/jhep.2001.23937>
- Cani, P.D., Amar, J., Iglesias, M.A., Poggi, M., Knauf, C., Bastelica, D., Neyrinck, A.M., Fava, F., Tuohy, K.M., Chabo, C., Waget, A., Delmée, E., Cousin, B., Sulpice, T., Chamontin, B., Ferrières, J., Tanti, J.-F., Gibson, G.R., Casteilla, L., Delzenne, N.M., Alessi, M.C., Burcelin, R., 2007. Metabolic Endotoxemia Initiates Obesity and Insulin Resistance. *Diabetes* 56, 1761–1772. <https://doi.org/10.2337/db06-1491>
- Cao, J., Dai, D.-L., Yao, L., Yu, H.-H., Ning, B., Zhang, Q., Chen, J., Cheng, W.-H., Shen, W., Yang, Z.-X., 2012. Saturated fatty acid induction of endoplasmic reticulum stress and apoptosis in human liver cells via the PERK/ATF4/CHOP signaling pathway. *Mol. Cell. Biochem.* 364, 115–129. <https://doi.org/10.1007/s11010-011-1211-9>
- Carr, R.M., Ahima, R.S., 2016. Pathophysiology of lipid droplet proteins in liver diseases. *Exp. Cell Res.* 340, 187–192.
- Caviglia, J.M., Gayet, C., Ota, T., Hernandez-Ono, A., Conlon, D.M., Jiang, H., Fisher, E.A., Ginsberg, H.N., 2011. Different fatty acids inhibit apoB100 secretion by different pathways: unique roles for ER stress, ceramide, and autophagy. *J. Lipid Res.* 52, 1636–1651. <https://doi.org/10.1194/jlr.M016931>
- Cazzolli, R., Carpenter, L., Biden, T.J., Schmitz-Peiffer, C., 2001. A Role for Protein Phosphatase 2A-Like Activity, but Not Atypical Protein Kinase C α , in the Inhibition of Protein Kinase B/Akt and Glycogen Synthesis by Palmitate 50.
- Cha, J.-Y., Repa, J.J., 2007. The Liver X Receptor (LXR) and Hepatic Lipogenesis. *J. Biol. Chem.* 282, 743–751. <https://doi.org/10.1074/jbc.M605023200>

- Chakravarthy, M.V., Lodhi, I.J., Yin, L., Malapaka, R.R.V., Xu, H.E., Turk, J., Semenkovich, C.F., 2009. Identification of a Physiologically Relevant Endogenous Ligand for PPAR α in Liver. *Cell* 138, 476–488. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.05.036>
- Chakravarthy, M.V., Pan, Z., Zhu, Y., Tordjman, K., Schneider, J.G., Coleman, T., Turk, J., Semenkovich, C.F., 2005. “New” hepatic fat activates PPAR α to maintain glucose, lipid, and cholesterol homeostasis. *Cell Metab.* 1, 309–322. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2005.04.002>
- Chavez, J.A., Summers, S.A., 2010. Lipid oversupply, selective insulin resistance, and lipotoxicity: Molecular mechanisms. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Biol. Lipids* 1801, 252–265. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2009.09.015>
- 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, 1679–1694.e3. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2017.01.055>
- Chen, C.-K., Yang, C.-Y., Hua, K.-T., Ho, M.-C., Johansson, G., Jeng, Y.-M., Chen, C.-N., Chen, M.-W., Lee, W.-J., Su, J.-L., Lai, T.-C., Chou, C.-C., Ho, B.-C., Chang, C.-F., Lee, P.-H., Chang, K.-J., Hsiao, M., Lin, M.-T., Kuo, M.-L., 2014. Leukocyte cell-derived chemotaxin 2 antagonizes MET receptor activation to suppress hepatocellular carcinoma vascular invasion by protein tyrosine phosphatase 1B recruitment. *Hepatology* 59, 974–985. <https://doi.org/10.1002/hep.26738>
- Chen, C.-K., Yu, W.-H., Cheng, T.-Y., Chen, M.-W., Su, C.-Y., Yang, Y.-C., Kuo, T.-C., Lin, M.-T., Huang, Y.-C., Hsiao, M., Hua, K.-T., Hung, M.-C., Kuo, M.-L., 2016. Inhibition of VEGF165/VEGFR2-dependent signaling by LECT2 suppresses hepatocellular carcinoma angiogenesis. *Sci. Rep.* 6, 31398. <https://doi.org/10.1038/srep31398>
- Chen, G., Liang, G., Ou, J., Goldstein, J.L., Brown, M.S., 2004. Central role for liver X receptor in insulin-mediated activation of Srebp-1c transcription and stimulation of fatty acid synthesis in liver. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101, 11245–11250. <https://doi.org/10.1073/pnas.0404297101>
- Chen, J., Chen, Q., Lu, X.-J., Li, C.-H., 2014. LECT2 improves the outcomes in ayu with *Vibrio anguillarum* infection via monocytes/macrophages. *Fish Shellfish Immunol.* 41, 586–592. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2014.10.012>
- Chen, J., Lu, X.J., Yang, H.Y., Shi, Y.H., 2010. An interaction between a C-type lectin receptor and leukocyte cell-derived chemotaxin 2 of ayu, *Plecoglossus altivelis*. *Fish Shellfish Immunol.* 28, 245–248. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2009.10.011>
- Chen, J., Yang, H.Y., Shi, Y.H., Li, M.Y., 2009. An interaction between leukocyte cell-derived chemotaxin 2 and transferrin of ayu, *Plecoglossus altivelis*. *Fish Shellfish Immunol.* 26, 536–542. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2009.02.010>
- Chen, J.D., Evans, R.M., 1995. A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors. *Nature* 377, 454–457. <https://doi.org/10.1038/377454a0>
- Chen, L., Ma, M.-Y., Sun, M., Jiang, L.-Y., Zhao, X.-T., Fang, X.-X., Man Lam, S., Shui, G.-H., Luo, J., Shi, X.-J., Song, B.-L., 2019. Endogenous sterol intermediates of the mevalonate pathway regulate HMGCR degradation and SREBP-2 processing. *J. Lipid Res.* 60, 1765–1775. <https://doi.org/10.1194/jlr.RA119000201>
- Chen, W., Chen, G., Head, D.L., Mangelsdorf, D.J., Russell, D.W., 2007. Enzymatic Reduction of Oxysterols Impairs LXR Signaling in Cultured Cells and the Livers of Mice. *Cell Metab.* 5, 73–79. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2006.11.012>
- Chiang, J.Y.L., Ferrell, J.M., 2022. Discovery of farnesoid X receptor and its role in bile acid metabolism. *Mol. Cell. Endocrinol.* 548, 111618. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2022.111618>
- Chu, K., Miyazaki, M., Man, W.C., Ntambi, J.M., 2006. Stearoyl-Coenzyme A Desaturase 1 Deficiency Protects against Hypertriglyceridemia and Increases Plasma High-

- Density Lipoprotein Cholesterol Induced by Liver X Receptor Activation. *Mol. Cell Biol.* 26, 6786–6798. <https://doi.org/10.1128/MCB.00077-06>
- Cook, J.R., Langlet, F., Kido, Y., Accili, D., 2015. Pathogenesis of Selective Insulin Resistance in Isolated Hepatocytes. *J. Biol. Chem.* 290, 13972–13980. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.638197>
- Copps, K.D., Hancer, N.J., Opare-Ado, L., Qiu, W., Walsh, C., White, M.F., 2010. Irs1 Serine 307 Promotes Insulin Sensitivity in Mice. *Cell Metab.* 11, 84–92. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2009.11.003>
- Costet, P., Luo, Y., Wang, N., Tall, A.R., 2000. Sterol-dependent Transactivation of the ABC1 Promoter by the Liver X Receptor/Retinoid X Receptor. *J. Biol. Chem.* 275, 28240–28245. <https://doi.org/10.1074/jbc.M003337200>
- Croci, I., Byrne, N.M., Choquette, S., Hills, A.P., Chachay, V.S., Clouston, A.D., O’Moore-Sullivan, T.M., Macdonald, G.A., Prins, J.B., Hickman, I.J., 2013. Whole-body substrate metabolism is associated with disease severity in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Gut* 62, 1625–1633. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2012-302789>
- Daemen, S., Gainullina, A., Kalugotla, G., He, L., Chan, M.M., Beals, J.W., Liss, K.H., Klein, S., Feldstein, A.E., Finck, B.N., Artyomov, M.N., Schilling, J.D., 2021. Dynamic Shifts in the Composition of Resident and Recruited Macrophages Influence Tissue Remodeling in NASH. *Cell Rep.* 34, 108626. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.108626>
- Dang, E.V., McDonald, J.G., Russell, D.W., Cyster, J.G., 2017. Oxysterol Restraint of Cholesterol Synthesis Prevents AIM2 Inflammasome Activation. *Cell* 171, 1057–1071.e11. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.09.029>
- Dasarathy, S., Yang, Y., McCullough, A.J., Marczewski, S., Bennett, C., Kalhan, S.C., 2011. Elevated hepatic fatty acid oxidation, high plasma fibroblast growth factor 21, and fasting bile acids in nonalcoholic steatohepatitis. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 23, 382–388. <https://doi.org/10.1097/MEG.0b013e328345c8c7>
- Dasgupta, S., Bhattacharya, Sushmita, Biswas, A., Majumdar, S.S., Mukhopadhyay, S., Ray, S., Bhattacharya, Samir, 2010. NF- κ B mediates lipid-induced fetuin-A expression in hepatocytes that impairs adipocyte function effecting insulin resistance. *Biochem. J.* 429, 451–462. <https://doi.org/10.1042/BJ20100330>
- Davis, R.C., Castellani, L.W., Hosseini, M., Ben-Zeev, O., Mao, H.Z., Weinstein, M.M., Jung, D.Y., Jun, J.Y., Kim, J.K., Lusis, A.J., Péterfy, M., 2010. Early Hepatic Insulin Resistance Precedes the Onset of Diabetes in Obese C57BLKS- *db/db* Mice. *Diabetes* 59, 1616–1625. <https://doi.org/10.2337/db09-0878>
- Day, C.P., James, O.F., 1998. Steatohepatitis: A Tale of Two “Hits”? *Gastroenterology* 114, 842–845.
- De La Roche, M., Hamilton, C., Mortensen, R., Jeyaprakash, A.A., Ghosh, S., Anand, P.K., 2018. Trafficking of cholesterol to the ER is required for NLRP3 inflammasome activation. *J. Cell Biol.* 217, 3560–3576. <https://doi.org/10.1083/jcb.201709057>
- De Santis, M.C., Porporato, P.E., Martini, M., Morandi, A., 2018. Signaling Pathways Regulating Redox Balance in Cancer Metabolism. *Front. Oncol.* 8, 126. <https://doi.org/10.3389/fonc.2018.00126>
- Demeure, O., Lecerf, F., Duby, C., Desert, C., Ducheix, S., Guillou, H., Lagarrigue, S., 2011. Regulation of LPCAT3 by LXR. *Gene* 470, 7–11. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2010.09.002>
- Denechaud, P.-D., Bossard, P., Lobaccaro, J.-M.A., Millatt, L., Staels, B., Girard, J., Postic, C., 2008. ChREBP, but not LXRs, is required for the induction of glucose-regulated genes in mouse liver. *J. Clin. Invest.* JCI34314. <https://doi.org/10.1172/JCI34314>

- Dentin, R., Pégorier, J.-P., Benhamed, F., Foufelle, F., Ferré, P., Fauveau, V., Magnuson, M.A., Girard, J., Postic, C., 2004. Hepatic Glucokinase Is Required for the Synergistic Action of ChREBP and SREBP-1c on Glycolytic and Lipogenic Gene Expression. *J. Biol. Chem.* 279, 20314–20326. <https://doi.org/10.1074/jbc.M312475200>
- Dentin, R., Tomas-Cobos, L., Foufelle, F., Leopold, J., Girard, J., Postic, C., Ferré, P., 2012. Glucose 6-phosphate, rather than xylulose 5-phosphate, is required for the activation of ChREBP in response to glucose in the liver. *J. Hepatol.* 56, 199–209. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2011.07.019>
- Diczfalusy, U., 2013. On the formation and possible biological role of 25-hydroxycholesterol. *Biochimie* 95, 455–460. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2012.06.016>
- Dong, Q., Giorgianni, F., Beranova-Giorgianni, S., Deng, X., O’Meally, R.N., Bridges, D., Park, E.A., Cole, R.N., Elam, M.B., Raghov, R., 2016. Glycogen synthase kinase-3-mediated phosphorylation of serine 73 targets sterol response element binding protein-1c (SREBP-1c) for proteasomal degradation. *Biosci. Rep.* 36, e00284. <https://doi.org/10.1042/BSR20150234>
- 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. *J. Clin. Invest.* 115, 1343–1351. <https://doi.org/10.1172/JCI23621>
- Ducheix, S., Podechard, N., Lasserre, F., Polizzi, A., Pommier, A., Murzilli, S., Di Lisio, C., D’Amore, S., Bertrand-Michel, J., Montagner, A., Pineau, T., Loiseau, N., Lobaccaro, J.-M., Martin, P.G.P., Guillou, H., 2013. A systems biology approach to the hepatic role of the oxysterol receptor LXR in the regulation of lipogenesis highlights a cross-talk with PPAR α . *Biochimie* 95, 556–567. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2012.09.028>
- Dudek, M., Pfister, D., Donakonda, S., Filpe, P., Schneider, A., Laschinger, M., Hartmann, D., Hüser, N., Meiser, P., Bayerl, F., Inverso, D., Wigger, J., Sebode, M., Öllinger, R., Rad, R., Hegenbarth, S., Anton, M., Guillot, A., Bowman, A., Heide, D., Müller, F., Ramadori, P., Leone, V., Garcia-Caceres, C., Gruber, T., Seifert, G., Kabat, A.M., Mallm, J.-P., Reider, S., Effenberger, M., Roth, S., Billeter, A.T., Müller-Stich, B., Pearce, E.J., Koch-Nolte, F., Käser, R., Tilg, H., Thimme, R., Boettler, T., Tacke, F., Dufour, J.-F., Haller, D., Murray, P.J., Heeren, R., Zehn, D., Böttcher, J.P., Heikenwälder, M., Knolle, P.A., 2021. Auto-aggressive CXCR6+ CD8 T cells cause liver immune pathology in NASH. *Nature* 592, 444–449. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03233-8>
- Dushay, J., Chui, P.C., Gopalakrishnan, G.S., Varela-Rey, M., Crawley, M., Fisher, F.M., Badman, M.K., Martinez-Chantar, M.L., Maratos-Flier, E., 2010. Increased Fibroblast Growth Factor 21 in Obesity and Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology* 139, 456–463. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2010.04.054>
- Duval, C., Touche, V., Tailleux, A., Fruchart, J.-C., Fievet, C., Clavey, V., Staels, B., Lestavel, S., 2006. Niemann–Pick C1 like 1 gene expression is down-regulated by LXR activators in the intestine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 340, 1259–1263. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.12.137>
- Dyson, J., Jaques, B., Chattopadhyay, D., Lochan, R., Graham, J., Das, D., Aslam, T., Patanwala, I., Gaggar, S., Cole, M., Sumpter, K., Stewart, S., Rose, J., Hudson, M., Manas, D., Reeves, H.L., 2014. Hepatocellular cancer: The impact of obesity, type 2 diabetes and a multidisciplinary team. *J. Hepatol.* 60, 110–117. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2013.08.011>
- Egnatchik, R.A., Leamy, A.K., Jacobson, D.A., Shiota, M., Young, J.D., 2014. ER calcium release promotes mitochondrial dysfunction and hepatic cell lipotoxicity in response to palmitate overload. *Mol. Metab.* 3, 544–553. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2014.05.004>

- Endo-Umeda, K., Nakashima, H., Komine-Aizawa, S., Umeda, N., Seki, S., Makishima, M., 2018a. Liver X receptors regulate hepatic F4/80 + CD11b+ Kupffer cells/macrophages and innate immune responses in mice. *Sci. Rep.* 8, 9281. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-27615-7>
- Endo-Umeda, K., Nakashima, H., Umeda, N., Seki, S., Makishima, M., 2018b. Dysregulation of Kupffer Cells/Macrophages and Natural Killer T Cells in Steatohepatitis in LXR α Knockout Male Mice. *Endocrinology* 159, 1419–1432. <https://doi.org/10.1210/en.2017-03141>
- Erridge, C., Attina, T., Spickett, C.M., Webb, D.J., 2007. A high-fat meal induces low-grade endotoxemia: evidence of a novel mechanism of postprandial inflammation. *Am. J. Clin. Nutr.* 86, 1286–1292. <https://doi.org/10.1093/ajcn/86.5.1286>
- Esler, W., Ross, T., Bergman, A., Crowley, C., Gonzalez, S.C., Beebe, D., Pfefferkorn, J.A., Amin, N., 2019. PS-109-Partial inhibition of de novo lipogenesis with the acetyl-CoA carboxylase inhibitor PF-05221304 does not increase circulating triglycerides in humans and is sufficient to lower steatosis in rats. *J. Hepatol.* 70, e69. [https://doi.org/10.1016/S0618-8278\(19\)30121-5](https://doi.org/10.1016/S0618-8278(19)30121-5)
- Estes, C., Razavi, H., Loomba, R., Younossi, Z., Sanyal, A.J., 2018. Modeling the epidemic of nonalcoholic fatty liver disease demonstrates an exponential increase in burden of disease. *Hepatology* 67, 123–133. <https://doi.org/10.1002/hep.29466>
- 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, 424–431. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2007.11.038>
- Fafalios, A., Ma, J., Tan, X., Stoops, J., Luo, J., DeFrances, M.C., Zarnegar, R., 2011. A hepatocyte growth factor receptor (Met)–insulin receptor hybrid governs hepatic glucose metabolism. *Nat. Med.* 17, 1577–1584. <https://doi.org/10.1038/nm.2531>
- Ferguson, D., Finck, B.N., 2021. Emerging therapeutic approaches for the treatment of NAFLD and type 2 diabetes mellitus. *Nat. Rev. Endocrinol.* 17, 484–495. <https://doi.org/10.1038/s41574-021-00507-z>
- Ferré, P., Phan, F., Foufelle, F., 2021. SREBP-1c and lipogenesis in the liver: an update. *Biochem. J.* 478, 3723–3739. <https://doi.org/10.1042/BCJ20210071>
- Ficht, X., Iannacone, M., 2020. Immune surveillance of the liver by T cells. *Sci. Immunol.* 5, eaba2351. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aba2351>
- Fitzgerald, M.L., Mujawar, Z., Tamehiro, N., 2010. ABC transporters, atherosclerosis and inflammation. *Atherosclerosis* 211, 361–370. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2010.01.011>
- Fleischmann, M., Iynedjian, P.B., 2000. Regulation of sterol regulatory-element binding protein 1 gene expression in liver: role of insulin and protein kinase B/cAkt. *Gene Expr.*
- Flowers, M.T., Keller, M.P., Choi, Y., Lan, H., Kendzierski, C., Ntambi, J.M., Attie, A.D., 2008. Liver gene expression analysis reveals endoplasmic reticulum stress and metabolic dysfunction in SCD1-deficient mice fed a very low-fat diet. *Physiol. Genomics* 33, 361–372. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00139.2007>
- Foretz, M., Ancellin, N., Andreelli, F., Saintillan, Y., Grondin, P., Kahn, A., Thorens, B., Vaulont, S., Viollet, B., 2005. Short-Term Overexpression of a Constitutively Active Form of AMP-Activated Protein Kinase in the Liver Leads to Mild Hypoglycemia and Fatty Liver. *Diabetes* 54, 1331–1339. <https://doi.org/10.2337/diabetes.54.5.1331>
- Foretz, M., Pacot, C., Dugail, I., Lemarchand, P., Guichard, C., Le Lièvre, X., Berthelie-Lubrano, C., Spiegelman, B., Kim, J.B., Ferré, P., Foufelle, F., 1999. ADD1/SREBP-1c Is Required in the Activation of Hepatic Lipogenic Gene Expression by Glucose. *Mol. Cell. Biol.* 19, 3760–3768. <https://doi.org/10.1128/MCB.19.5.3760>

- Friedman, S.L., Neuschwander-Tetri, B.A., Rinella, M., Sanyal, A.J., 2018. Mechanisms of NAFLD development and therapeutic strategies. *Nat. Med.* 24, 908–922. <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0104-9>
- Fromenty, B., Roden, M., 2023. Mitochondrial alterations in fatty liver diseases. *J. Hepatol.* 78, 415–429. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2022.09.020>
- Fu, S., Fan, J., Blanco, J., Gimenez-Cassina, A., Danial, N.N., Watkins, S.M., Hotamisligil, G.S., 2012. Polysome Profiling in Liver Identifies Dynamic Regulation of Endoplasmic Reticulum Translatome by Obesity and Fasting. *PLoS Genet.* 8, e1002902. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002902>
- Fu, S., Yang, L., Li, P., Hofmann, O., Dicker, L., Hide, W., Lin, X., Watkins, S.M., Ivanov, A.R., Hotamisligil, G.S., 2011. Aberrant lipid metabolism disrupts calcium homeostasis causing liver endoplasmic reticulum stress in obesity. *Nature* 473, 528–531. <https://doi.org/10.1038/nature09968>
- Fuchs, A., Samovski, D., Smith, G.I., Cifarelli, V., Farabi, S.S., Yoshino, J., Pietka, T., Chang, S.-W., Ghosh, S., Myckatyn, T.M., Klein, S., 2021. Associations Among Adipose Tissue Immunology, Inflammation, Exosomes and Insulin Sensitivity in People With Obesity and Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology* 161, 968-981.e12. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2021.05.008>
- Fuchs, C.D., Trauner, M., 2022. Role of bile acids and their receptors in gastrointestinal and hepatic pathophysiology. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 19, 432–450. <https://doi.org/10.1038/s41575-021-00566-7>
- Funcke, J.-B., Scherer, P.E., 2019. Beyond adiponectin and leptin: adipose tissue-derived mediators of inter-organ communication. *J. Lipid Res.* 60, 1648–1697. <https://doi.org/10.1194/jlr.R094060>
- Gälman, C., Lundåsen, T., Kharitonov, A., Bina, H.A., Eriksson, M., Hafström, I., Dahlin, M., Åmark, P., Angelin, B., Rudling, M., 2008. The Circulating Metabolic Regulator FGF21 Is Induced by Prolonged Fasting and PPAR α Activation in Man. *Cell Metab.* 8, 169–174. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2008.06.014>
- Gao, Y., Fan, S., Zhao, P., Li, H., Cai, C., Li, X., Zhou, Y., Huang, M., Bi, H., 2023. β -catenin/TCF4 inhibitors ICG-001 and LF3 alleviate BDL-induced liver fibrosis by suppressing LECT2 signaling. *Chem. Biol. Interact.* 371, 110350. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2023.110350>
- Garcia-Vallejo, J.J., Van Kooyk, Y., 2013. The physiological role of DC-SIGN: A tale of mice and men. *Trends Immunol.* 34, 482–486. <https://doi.org/10.1016/j.it.2013.03.001>
- Gastaldelli, A., Baldi, S., Pettiti, M., Toschi, E., Camastra, S., Natali, A., Landau, B.R., Ferrannini, E., 2000. Influence of obesity and type 2 diabetes on gluconeogenesis and glucose output in humans: a quantitative study. *Diabetes* 49, 1367–1373. <https://doi.org/10.2337/diabetes.49.8.1367>
- Gauldie, J., Bonniaud, P., Margetts, P., Sime, P., Ask, K., Kolb, M., 2007. TGF β and Smad3 link inflammation to progressive fibrosis. *Int. Congr. Ser.* 1302, 103–113. <https://doi.org/10.1016/j.ics.2006.10.025>
- Geng, L., Lam, K.S.L., Xu, A., 2020. The therapeutic potential of FGF21 in metabolic diseases: from bench to clinic. *Nat. Rev. Endocrinol.* 16, 654–667. <https://doi.org/10.1038/s41574-020-0386-0>
- Gerst, F., Wagner, R., Kaiser, G., Panse, M., Heni, M., Machann, J., Bongers, M.N., Sartorius, T., Sipos, B., Fend, F., Thiel, C., Nadalin, S., Königsrainer, A., Stefan, N., Fritsche, A., Häring, H.-U., Ullrich, S., Siegel-Axel, D., 2017. Metabolic crosstalk between fatty pancreas and fatty liver: effects on local inflammation and insulin secretion. *Diabetologia* 60, 2240–2251. <https://doi.org/10.1007/s00125-017-4385-1>
- Ghisletti, S., Huang, W., Ogawa, S., Pascual, G., Lin, M.-E., Willson, T.M., Rosenfeld, M.G., Glass, C.K., 2007. Parallel SUMOylation-Dependent Pathways Mediate Gene- and

- Signal-Specific Transrepression by LXRs and PPAR γ . *Mol. Cell* 25, 57–70. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2006.11.022>
- Glass, C.K., Rosenfeld, M.G., 2000. The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors. *Genes Dev.* 14, 121–141. <https://doi.org/10.1101/gad.14.2.121>
- Glass, O., Henao, R., Patel, K., Guy, C.D., Gruss, H.J., Syn, W.-K., Moylan, C.A., Streilein, R., Hall, R., Diehl, A.M., Abdelmalek, M.F., 2018. Serum Interleukin-8, Osteopontin, and Monocyte Chemoattractant Protein 1 Are Associated With Hepatic Fibrosis in Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Hepatol. Commun.* 2, 1344–1355. <https://doi.org/10.1002/hep4.1237>
- Goldstein, J.L., DeBose-Boyd, R.A., Brown, M.S., 2006. Protein Sensors for Membrane Sterols. *Cell* 124, 35–46. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.12.022>
- Gomes, A.L., Teijeiro, A., Burén, S., Tummala, K.S., Yilmaz, M., Waisman, A., Theurillat, J.-P., Perna, C., Djouder, N., 2016. Metabolic Inflammation-Associated IL-17A Causes Non-alcoholic Steatohepatitis and Hepatocellular Carcinoma. *Cancer Cell* 30, 161–175. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2016.05.020>
- Gomez Perdiguero, E., Klapproth, K., Schulz, C., Busch, K., Azzoni, E., Crozet, L., Garner, H., Trouillet, C., De Bruijn, M.F., Geissmann, F., Rodewald, H.-R., 2015. Tissue-resident macrophages originate from yolk-sac-derived erythro-myeloid progenitors. *Nature* 518, 547–551. <https://doi.org/10.1038/nature13989>
- Gong, Y., Lee, J.N., Lee, P.C.W., Goldstein, J.L., Brown, M.S., Ye, J., 2006. Sterol-regulated ubiquitination and degradation of Insig-1 creates a convergent mechanism for feedback control of cholesterol synthesis and uptake. *Cell Metab.* 3, 15–24. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2005.11.014>
- Grabner, G.F., Xie, H., Schweiger, M., Zechner, R., 2021. Lipolysis: cellular mechanisms for lipid mobilization from fat stores. *Nat. Metab.* 3, 1445–1465. <https://doi.org/10.1038/s42255-021-00493-6>
- Greenow, K.R., Zverev, M., May, S., Kendrick, H., Williams, G.T., Pheese, T., Parry, L., 2018. Lect2 deficiency is characterised by altered cytokine levels and promotion of intestinal tumourigenesis. *Oncotarget* 9, 36430–36443. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.26335>
- Gregor, M.F., Yang, L., Fabbrini, E., Mohammed, B.S., Eagon, J.C., Hotamisligil, G.S., Klein, S., 2009. Endoplasmic Reticulum Stress Is Reduced in Tissues of Obese Subjects After Weight Loss. *Diabetes* 58, 693–700. <https://doi.org/10.2337/db08-1220>
- Griffett, K., Welch, R.D., Flaveny, C.A., Kolar, G.R., Neuschwander-Tetri, B.A., Burris, T.P., 2015. The LXR inverse agonist SR9238 suppresses fibrosis in a model of non-alcoholic steatohepatitis. *Mol. Metab.* 4, 353–357. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2015.01.009>
- Grohmann, M., Wiede, F., Dodd, G.T., Gurzov, E.N., Ooi, G.J., Butt, T., Rasmiena, A.A., Kaur, S., Gulati, T., Goh, P.K., Treloar, A.E., Archer, S., Brown, W.A., Muller, M., Watt, M.J., Ohara, O., McLean, C.A., Tiganis, T., 2018. Obesity Drives STAT-1-Dependent NASH and STAT-3-Dependent HCC. *Cell* 175, 1289–1306.e20. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.09.053>
- Guilliams, M., Bonnardel, J., Haest, B., Vanderborght, B., Wagner, C., Remmerie, A., Bujko, A., Martens, L., Thoné, T., Browaeys, R., De Ponti, F.F., Vanneste, B., Zwicker, C., Svedberg, F.R., Vanhalewyn, T., Gonçalves, A., Lippens, S., Devriendt, B., Cox, E., Ferrero, G., Wittamer, V., Willaert, A., Kaptein, S.J.F., Neyts, J., Dallmeier, K., Geldhof, P., Casaert, S., Deplancke, B., ten Dijke, P., Hoorens, A., Vanlander, A., Berrevoet, F., Van Nieuwenhove, Y., Saeys, Y., Saelens, W., Van Vlierberghe, H., Devisscher, L., Scott, C.L., 2022. Spatial proteogenomics reveals distinct and evolutionarily conserved hepatic macrophage niches. *Cell* 185, 379–396.e38. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.12.018>

- Guilliams, M., Scott, C.L., 2022. Liver macrophages in health and disease. *Immunity* 55, 1515–1529. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2022.08.002>
- Guilliams, M., Thierry, G.R., Bonnardel, J., Bajenoff, M., 2020. Establishment and Maintenance of the Macrophage Niche. *Immunity* 52, 434–451. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.02.015>
- Guo, C., Chi, Z., Jiang, D., Xu, T., Yu, W., Wang, Z., Chen, S., Zhang, L., Liu, Q., Guo, X., Zhang, X., Li, W., Lu, L., Wu, Y., Song, B.-L., Wang, D., 2018. Cholesterol Homeostatic Regulator SCAP-SREBP2 Integrates NLRP3 Inflammasome Activation and Cholesterol Biosynthetic Signaling in Macrophages. *Immunity* 49, 842–856.e7. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.08.021>
- Guo, S., 2014. Insulin signaling, resistance, and metabolic syndrome: insights from mouse models into disease mechanisms. *J. Endocrinol.* 220, T1–T23. <https://doi.org/10.1530/JOE-13-0327>
- Guo, Z., Li, M., Han, B., Qi, X., 2018. Association of non-alcoholic fatty liver disease with thyroid function: A systematic review and meta-analysis. *Dig. Liver Dis.* 50, 1153–1162. <https://doi.org/10.1016/j.dld.2018.08.012>
- Guri, Y., Colombi, M., Dazert, E., Hindupur, S.K., Roszik, J., Moes, S., Jenoe, P., Heim, M.H., Riezman, I., Riezman, H., Hall, M.N., 2017. mTORC2 Promotes Tumorigenesis via Lipid Synthesis. *Cancer Cell* 32, 807–823.e12. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2017.11.011>
- Guzmán, M., Bijleveld, C., Geelen, M.J.H., 1995. Flexibility of zonation of fatty acid oxidation in rat liver. *Biochem. J.* 311, 853–860. <https://doi.org/10.1042/bj3110853>
- Gwinn, D.M., Shackelford, D.B., Egan, D.F., Mihaylova, M.M., Mery, A., Vasquez, D.S., Turk, B.E., Shaw, R.J., 2008. AMPK Phosphorylation of Raptor Mediates a Metabolic Checkpoint. *Mol. Cell* 30, 214–226. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.03.003>
- Haas, J.T., Miao, J., Chanda, D., Wang, Y., Zhao, E., Haas, M.E., Hirschey, M., Vaitheesvaran, B., Farese, R.V., Kurland, I.J., Graham, M., Crooke, R., Fougelle, F., Biddinger, S.B., 2012. Hepatic Insulin Signaling Is Required for Obesity-Dependent Expression of SREBP-1c mRNA but Not for Feeding-Dependent Expression. *Cell Metab.* 15, 873–884. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.05.002>
- Haas, J.T., Vonghia, L., Mogilenko, D.A., Verrijken, A., Molendi-Coste, O., Fleury, S., Deprince, A., Nikitin, A., Woitrain, E., Ducrocq-Geoffroy, L., Pic, S., Derudas, B., Dehondt, H., Gheeraert, C., Van Gaal, L., Driessen, A., Lefebvre, P., Staels, B., Francque, S., Dombrowicz, D., 2019. Transcriptional network analysis implicates altered hepatic immune function in NASH development and resolution. *Nat. Metab.* 1, 604–614. <https://doi.org/10.1038/s42255-019-0076-1>
- Hajduch, E., Lachkar, F., Ferré, P., Fougelle, F., 2021. Roles of Ceramides in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *J. Clin. Med.* 10, 792. <https://doi.org/10.3390/jcm10040792>
- Haukeland, J.W., Dahl, T.B., Yndestad, A., Gladhaug, I.P., Løberg, E.M., Haaland, T., Konopski, Z., Wium, C., Aasheim, E.T., Johansen, O.E., Aukrust, P., Halvorsen, B., Birkeland, K.I., 2012. Fetuin A in nonalcoholic fatty liver disease: in vivo and in vitro studies. *Eur. J. Endocrinol.* 166, 503–510. <https://doi.org/10.1530/EJE-11-0864>
- Hayden, M.S., Ghosh, S., 2011. NF- κ B in immunobiology. *Cell Res.* 21, 223–244. <https://doi.org/10.1038/cr.2011.13>
- He, W.-M., Dai, T., Chen, J., Wang, J.-A., 2019. Leukocyte cell-derived chemotaxin 2 inhibits development of atherosclerosis in mice. *Zool. Res.* 40, 317–323. <https://doi.org/10.24272/j.issn.2095-8137.2019.030>
- Heeren, J., Scheja, L., 2021. Metabolic-associated fatty liver disease and lipoprotein metabolism. *Mol. Metab.* 50. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2021.101238>
- Hegarty, B.D., Bobard, A., Hainault, I., Ferré, P., Bossard, P., Fougelle, F., 2005. Distinct roles of insulin and liver X receptor in the induction and cleavage of sterol regulatory

- elementbinding protein-1c. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102, 791–796. <https://doi.org/10.1073/pnas.0405067102>
- Hellerbrand, C., Stefanovic, B., Giordano, F., Burchardt, E.R., Brenner, D.A., 1999. The role of TGF β 1 in initiating hepatic stellate cell activation in vivo. *J. Hepatol.* 30, 77–87.
- Henaó-Mejía, J., Elinav, E., Jin, C., Hao, L., Mehal, W.Z., Strowig, T., Thaiss, C.A., Kau, A.L., Eisenbarth, S.C., Jurczak, M.J., Camporez, J.-P., Shulman, G.I., Gordon, J.I., Hoffman, H.M., Flavell, R.A., 2012. Inflammasome-mediated dysbiosis regulates progression of NAFLD and obesity. *Nature* 482, 179–185. <https://doi.org/10.1038/nature10809>
- Heymann, F., Tacke, F., 2016. Immunology in the liver – from homeostasis to disease. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 13, 88–110. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2015.200>
- Higuchi, N., Kato, M., Tanaka, M., Miyazaki, M., Takao, S., Kohjima, M., Kotoh, K., Enjoji, M., Nakamuta, M., Takayanagi, R., 2011. Effects of insulin resistance and hepatic lipid accumulation on hepatic mRNA expression levels of apoB, MTP and L-FABP in non-alcoholic fatty liver disease. *Exp. Ther. Med.* 2, 1077–1081. <https://doi.org/10.3892/etm.2011.328>
- Hirosumi, J., Tuncman, G., Chang, L., Görgün, C.Z., Uysal, K.T., Maeda, K., Karin, M., Hotamisligil, G.S., 2002. A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature* 420, 333–336. <https://doi.org/10.1038/nature01137>
- Hodson, L., Gunn, P.J., 2019. The regulation of hepatic fatty acid synthesis and partitioning: the effect of nutritional state. *Nat. Rev. Endocrinol.* 15, 689–700. <https://doi.org/10.1038/s41574-019-0256-9>
- Holeček, M., 2023. Roles of malate and aspartate in gluconeogenesis in various physiological and pathological states. *Metabolism* 145, 155614. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2023.155614>
- Honda, M., Kimura, C., Uede, T., Kon, S., 2020. Neutralizing antibody against osteopontin attenuates non-alcoholic steatohepatitis in mice. *J. Cell Commun. Signal.* 14, 223–232. <https://doi.org/10.1007/s12079-020-00554-7>
- Hörlein, A.J., Näär, A.M., Heinzl, T., Torchia, J., Gloss, B., Kurokawa, R., Ryan, A., Kamei, Y., Söderström, M., Glass, C.K., Rosenfeld, M.G., 1995. Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor. *Nature* 377, 397–404. <https://doi.org/10.1038/377397a0>
- Hotamisligil, G.S., Arner, P., Caro, J.F., Atkinson, R.L., Spiegelman, B.M., 1995. Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor- α in human obesity and insulin resistance. *J. Clin. Invest.* 95, 2409–2415. <https://doi.org/10.1172/JCI117936>
- Hotamisligil, G.S., Shargill, N.S., Spiegelman, B.M., 1993. Adipose Expression of Tumor Necrosis Factor- α : Direct Role in Obesity-Linked Insulin Resistance. *Science* 259, 87–91. <https://doi.org/10.1126/science.7678183>
- Hua, X., Sakai, J., Y. K., H., Goldstein, J.L., Brown, M.S., 1995. Hairpin Orientation of Sterol Regulatory Element-binding Protein-2 in Cell Membranes as Determined by Protease Protection. *J. Biol. Chem.* 270, 29422–29427. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.49.29422>
- Huang, D.Q., El-Serag, H.B., Loomba, R., 2021. Global epidemiology of NAFLD-related HCC: trends, predictions, risk factors and prevention. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 18, 223–238. <https://doi.org/10.1038/s41575-020-00381-6>
- Hung, W.-Y., Chang, J.-H., Cheng, Y., Chen, C.-K., Chen, J.-Q., Hua, K.-T., Cheng, C.-W., Hsiao, M., Chung, C.-L., Lee, W.-J., Chien, M.-H., 2018. Leukocyte Cell-Derived Chemotaxin 2 Retards Non-Small Cell Lung Cancer Progression Through Antagonizing MET and EGFR Activities. *Cell. Physiol. Biochem.* 51, 337–355. <https://doi.org/10.1159/000495233>
- Hwahng, S.H., Ki, S.H., Bae, E.J., Kim, H.E., Kim, S.G., 2009. Role of adenosine monophosphate-activated protein kinase-p70 ribosomal S6 kinase-1 pathway in repression of liver X receptor- α -dependent lipogenic gene induction and hepatic

- steatosis by a novel class of dithiolethiones. *Hepatology* 49, 1913–1925. <https://doi.org/10.1002/hep.22887>
- Hwang, H.-J., Jung, T.W., Hong, H.C., Seo, J.A., Kim, S.G., Kim, N.H., Choi, K.M., Choi, D.S., Baik, S.H., Yoo, H.J., 2015a. LECT2 induces atherosclerotic inflammatory reaction via CD209 receptor-mediated JNK phosphorylation in human endothelial cells. *Metabolism* 64, 1175–1182. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2015.06.001>
- Hwang, H.-J., Jung, T.W., Kim, B.-H., Hong, H.C., Seo, J.A., Kim, S.G., Kim, N.H., Choi, K.M., Choi, D.S., Baik, S.H., Yoo, H.J., 2015b. A dipeptidyl peptidase-IV inhibitor improves hepatic steatosis and insulin resistance by AMPK-dependent and JNK-dependent inhibition of LECT2 expression. *Biochem. Pharmacol.* 98, 157–166. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2015.08.098>
- Ide, T., Shimano, H., Yoshikawa, T., Yahagi, N., Amemiya-Kudo, M., Matsuzaka, T., Nakakuki, M., Yatoh, S., Iizuka, Y., Tomita, S., Ohashi, K., Takahashi, A., Sone, H., Gotoda, T., Osuga, J., Ishibashi, S., Yamada, N., 2003. Cross-Talk between Peroxisome Proliferator-Activated Receptor (PPAR) α and Liver X Receptor (LXR) in Nutritional Regulation of Fatty Acid Metabolism. II. LXRs Suppress Lipid Degradation Gene Promoters through Inhibition of PPAR Signaling. *Mol. Endocrinol.* 17, 1255–1267. <https://doi.org/10.1210/me.2002-0191>
- Iizuka, K., Bruick, R.K., Liang, G., Horton, J.D., Uyeda, K., 2004. Deficiency of carbohydrate response element-binding protein (ChREBP) reduces lipogenesis as well as glycolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101, 7281–7286. <https://doi.org/10.1073/pnas.0401516101>
- Imai, Y., Boyle, S., Varela, G.M., Caron, E., Yin, X., Dhir, Raina, Dhir, Ravindra, Graham, M.J., Ahima, R.S., 2012. Effects of perilipin 2 antisense oligonucleotide treatment on hepatic lipid metabolism and gene expression. *Physiol. Genomics* 44, 1125–1131. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00045.2012>
- Imai, Y., Varela, G.M., Jackson, M.B., Graham, M.J., Crooke, R.M., Ahima, R.S., 2007. Reduction of Hepatosteatosis and Lipid Levels by an Adipose Differentiation-Related Protein Antisense Oligonucleotide. *Gastroenterology* 132, 1947–1954. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2007.02.046>
- Inagaki, T., Choi, M., Moschetta, A., Peng, L., Cummins, C.L., McDonald, J.G., Luo, G., Jones, S.A., Goodwin, B., Richardson, J.A., Gerard, R.D., Repa, J.J., Mangelsdorf, D.J., Kliewer, S.A., 2005. Fibroblast growth factor 15 functions as an enterohepatic signal to regulate bile acid homeostasis. *Cell Metab.* 2, 217–225. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2005.09.001>
- Inagaki, T., Dutchak, P., Zhao, G., Ding, X., Gautron, L., Parameswara, V., Li, Y., Goetz, R., Mohammadi, M., Esser, V., Elmquist, J.K., Gerard, R.D., Burgess, S.C., Hammer, R.E., Mangelsdorf, D.J., Kliewer, S.A., 2007. Endocrine Regulation of the Fasting Response by PPAR α -Mediated Induction of Fibroblast Growth Factor 21. *Cell Metab.* 5, 415–425. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2007.05.003>
- Inoki, K., Zhu, T., Guan, K.-L., 2003. TSC2 Mediates Cellular Energy Response to Control Cell Growth and Survival. *Cell* 115, 577–590. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00929-2](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00929-2)
- Ioannou, G.N., 2016. The Role of Cholesterol in the Pathogenesis of NASH. *Trends Endocrinol. Metab.* 27, 84–95. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2015.11.008>
- Ioannou, G.N., Haigh, W.G., Thorning, D., Savard, C., 2013. Hepatic cholesterol crystals and crown-like structures distinguish NASH from simple steatosis. *J. Lipid Res.* 54, 1326–1334. <https://doi.org/10.1194/jlr.M034876>
- Ioannou, G.N., Van Rooyen, D.M., Savard, C., Haigh, W.G., Yeh, M.M., Teoh, N.C., Farrell, G.C., 2015. Cholesterol-lowering drugs cause dissolution of cholesterol crystals and

- disperse Kupffer cell crown-like structures during resolution of NASH. *J. Lipid Res.* 56, 277–285. <https://doi.org/10.1194/jlr.M053785>
- Ipsen, D.H., Lykkesfeldt, J., Tveden-Nyborg, P., 2018. Molecular mechanisms of hepatic lipid accumulation in non-alcoholic fatty liver disease. *Cell. Mol. Life Sci.* 75, 3313–3327. <https://doi.org/10.1007/s00018-018-2860-6>
- Iroz, A., Montagner, A., Benhamed, F., Levavasseur, F., Polizzi, A., Anthony, E., Régnier, M., Fouché, E., Lukowicz, C., Cauzac, M., Tournier, E., Do-Cruzeiro, M., Daujat-Chavanieu, M., Gerbal-Chalouin, S., Fauveau, V., Marmier, S., Burnol, A.-F., Guilmeau, S., Lippi, Y., Girard, J., Wahli, W., Dentin, R., Guillou, H., Postic, C., 2017. A Specific ChREBP and PPAR α Cross-Talk Is Required for the Glucose-Mediated FGF21 Response. *Cell Rep.* 21, 403–416. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.09.065>
- Ito, A., Hong, C., Rong, X., Zhu, X., Tarling, E.J., Hedde, P.N., Gratton, E., Parks, J., Tontonoz, P., 2015. LXRs link metabolism to inflammation through Abca1-dependent regulation of membrane composition and TLR signaling. *eLife* 4, e08009. <https://doi.org/10.7554/eLife.08009>
- Iwaisako, K., Jiang, C., Zhang, M., Cong, M., Moore-Morris, T.J., Park, T.J., Liu, X., Xu, J., Wang, P., Paik, Y.-H., Meng, F., Asagiri, M., Murray, L.A., Hofmann, A.F., Iida, T., Glass, C.K., Brenner, D.A., Kisseleva, T., 2014. Origin of myofibroblasts in the fibrotic liver in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111. <https://doi.org/10.1073/pnas.1400062111>
- Jacinto, E., Facchinetti, V., Liu, D., Soto, N., Wei, S., Jung, S.Y., Huang, Q., Qin, J., Su, B., 2006. SIN1/MIP1 Maintains rictor-mTOR Complex Integrity and Regulates Akt Phosphorylation and Substrate Specificity. *Cell* 127, 125–137. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.08.033>
- Jahn, D., Rau, M., Hermanns, H.M., Geier, A., 2015. Mechanisms of enterohepatic fibroblast growth factor 15/19 signaling in health and disease. *Cytokine Growth Factor Rev.* 26, 625–635. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2015.07.016>
- Janowski, B.A., Willy, P.J., Rama Devi, T., Falck, J.R., Mangelsdorf, D.J., 1996. An oxysterol signalling pathway mediated by the nuclear receptor LXR α . *Nature* 728–731.
- Jenne, C.N., Kubes, P., 2013. Immune surveillance by the liver. *Nat. Immunol.* 14, 996–1006. <https://doi.org/10.1038/ni.2691>
- Jeronimo, S.M.B., Holst, A.K.B., Jamieson, S.E., Francis, R., Martins, D.R.A., Bezerra, F.L., Ettinger, N.A., Nascimento, E.T., Monteiro, G.R., Lacerda, H.G., Miller, E.N., Cordell, H.J., Duggal, P., Beaty, T.H., Blackwell, J.M., Wilson, M.E., 2007. Genes at human chromosome 5q31.1 regulate delayed-type hypersensitivity responses associated with *Leishmania chagasi* infection. *Genes Immun.* 8, 539–551. <https://doi.org/10.1038/sj.gene.6364422>
- Jiang, C., Xie, C., Li, F., Zhang, L., Nichols, R.G., Krausz, K.W., Cai, J., Qi, Y., Fang, Z.-Z., Takahashi, S., Tanaka, N., Desai, D., Amin, S.G., Albert, I., Patterson, A.D., Gonzalez, F.J., 2015. Intestinal farnesoid X receptor signaling promotes nonalcoholic fatty liver disease. *J. Clin. Invest.* 125, 386–402. <https://doi.org/10.1172/JCI76738>
- Jo, E.-K., Kim, J.K., Shin, D.-M., Sasakawa, C., 2016. Molecular mechanisms regulating NLRP3 inflammasome activation. *Cell. Mol. Immunol.* 13, 148–159. <https://doi.org/10.1038/cmi.2015.95>
- Johanns, M., Hue, L., Rider, M.H., 2023. AMPK inhibits liver gluconeogenesis: fact or fiction? *Biochem. J.* 480, 105–125. <https://doi.org/10.1042/BCJ20220582>
- Johns, I., Frost, G., Dornhorst, A., 2020. Increasing the proportion of plasma MUFA, as a result of dietary intervention, is associated with a modest improvement in insulin sensitivity. *J. Nutr. Sci.* 9, e6. <https://doi.org/10.1017/jns.2019.29>
- Joseph, S.B., Laffitte, B.A., Patel, P.H., Watson, M.A., Matsukuma, K.E., Walczak, R., Collins, J.L., Osborne, T.F., Tontonoz, P., 2002. Direct and Indirect Mechanisms for Regulation

- of Fatty Acid Synthase Gene Expression by Liver X Receptors. *J. Biol. Chem.* 277, 11019–11025. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111041200>
- Jung, T.W., Chung, Y.H., Kim, H.-C., Abd El-Aty, A.M., Jeong, J.H., 2018. LECT2 promotes inflammation and insulin resistance in adipocytes via P38 pathways. *J. Mol. Endocrinol.* 61, 37–45. <https://doi.org/10.1530/JME-17-0267>
- Jungermann, K., Katz, N., 1989. Functional specialization of different hepatocyte populations. *Physiol. Rev.* 69, 708–764. <https://doi.org/10.1152/physrev.1989.69.3.708>
- Kakuma, T., Lee, Y., Higa, M., Wang, Z., Pan, W., Shimomura, I., Unger, R.H., 2000. Leptin, troglitazone, and the expression of sterol regulatory element binding proteins in liver and pancreatic islets. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97, 8536–8541. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.15.8536>
- Kalaany, N.Y., Gauthier, K.C., Zavacki, A.M., Mammen, P.P.A., Kitazume, T., Peterson, J.A., Horton, J.D., Garry, D.J., Bianco, A.C., Mangelsdorf, D.J., 2005. LXRs regulate the balance between fat storage and oxidation. *Cell Metab.* 1, 231–244. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2005.03.001>
- Kameoka, Y., Yamagoe, S., Hatano, Y., Kasama, T., Suzuki, K., 2000. Val58Ile polymorphism of the neutrophil chemoattractant LECT2 and rheumatoid arthritis in the Japanese population. *Arthritis Rheum.* 43, 1419–1420. [https://doi.org/10.1002/1529-0131\(200006\)43:6<1419::AID-ANR28>3.0.CO;2-I](https://doi.org/10.1002/1529-0131(200006)43:6<1419::AID-ANR28>3.0.CO;2-I)
- Karlmarm, K.R., Weiskirchen, R., Zimmermann, H.W., Gassler, N., Ginhoux, F., Weber, C., Merad, M., Luedde, T., Trautwein, C., Tacke, F., 2009. Hepatic recruitment of the inflammatory Gr1⁺ monocyte subset upon liver injury promotes hepatic fibrosis. *Hepatology* 50, 261–274. <https://doi.org/10.1002/hep.22950>
- Kaur, P., Rizk, N.M., Ibrahim, S., Younes, N., Uppal, A., Dennis, K., Karve, T., Blakeslee, K., Kwagyan, J., Zirie, M., Resson, H.W., Cheema, A.K., 2012. iTRAQ-Based Quantitative Protein Expression Profiling and MRM Verification of Markers in Type 2 Diabetes. *J. Proteome Res.* 11, 5527–5539. <https://doi.org/10.1021/pr300798z>
- Kawaguchi, T., Osatomi, K., Yamashita, H., Kabashima, T., Uyeda, K., 2002. Mechanism for Fatty Acid “Sparing” Effect on Glucose-induced Transcription. *J. Biol. Chem.* 277, 3829–3835. <https://doi.org/10.1074/jbc.M107895200>
- Kawaguchi, T., Takenoshita, M., Kabashima, T., Uyeda, K., 2001. Glucose and cAMP regulate the L-type pyruvate kinase gene by phosphorylation/dephosphorylation of the carbohydrate response element binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98, 13710–13715. <https://doi.org/10.1073/pnas.231370798>
- Kennedy, M.A., Venkateswaran, A., Tarr, P.T., Xenarios, I., Kudoh, J., Shimizu, N., Edwards, P.A., 2001. Characterization of the Human ABCG1 Gene. *J. Biol. Chem.* 276, 39438–39447. <https://doi.org/10.1074/jbc.M105863200>
- Kersten, S., Seydoux, J., Peters, J.M., Gonzalez, F.J., Desvergne, B., Wahli, W., 1999. Peroxisome proliferator-activated receptor α mediates the adaptive response to fasting. *J. Clin. Invest.* 103, 1489–1498. <https://doi.org/10.1172/JCI6223>
- Kharitonov, A., Shiyanova, T.L., Koester, A., Ford, A.M., Micanovic, R., Galbreath, E.J., Sandusky, G.E., Hammond, L.J., Moyers, J.S., Owens, R.A., Gromada, J., Brozinick, J.T., Hawkins, E.D., Wroblewski, V.J., Li, D.-S., Mehrbod, F., Jaskunas, S.R., Shanafelt, A.B., 2005. FGF-21 as a novel metabolic regulator. *J. Clin. Invest.* 115, 1627–1635. <https://doi.org/10.1172/JCI23606>
- Kiefer, F.W., Zeyda, M., Gollinger, K., Pfau, B., Neuhofer, A., Weichhart, T., Säemann, M.D., Geyeregger, R., Schleder, M., Kenner, L., Stulnig, T.M., 2010. Neutralization of Osteopontin Inhibits Obesity-Induced Inflammation and Insulin Resistance. *Diabetes* 59, 935–946. <https://doi.org/10.2337/db09-0404>

- Kim, J.K., Gavrilova, O., Chen, Y., Reitman, M.L., Shulman, G.I., 2000. Mechanism of Insulin Resistance in A-ZIP/F-1 Fatless Mice. *J. Biol. Chem.* 275, 8456–8460. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.12.8456>
- Kim, J.Y., Garcia-Carbonell, R., Yamachika, S., Zhao, P., Dhar, D., Loomba, R., Kaufman, R.J., Saltiel, A.R., Karin, M., 2018. ER Stress Drives Lipogenesis and Steatohepatitis via Caspase-2 Activation of S1P. *Cell* 175, 133–145.e15. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.08.020>
- Kirpich, I.A., Gobejishvili, L.N., Homme, M.B., Waigel, S., Cave, M., Arteel, G., Barve, S.S., McClain, C.J., Deaciuc, I.V., 2011. Integrated hepatic transcriptome and proteome analysis of mice with high-fat diet-induced nonalcoholic fatty liver disease. *J. Nutr. Biochem.* 22, 38–45. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2009.11.009>
- Kisseleva, T., Brenner, D., 2021. Molecular and cellular mechanisms of liver fibrosis and its regression. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 18, 151–166. <https://doi.org/10.1038/s41575-020-00372-7>
- Kleiner, D.E., Brunt, E.M., Van Natta, M., Behling, C., Contos, M.J., Cummings, O.W., Ferrell, L.D., Liu, Y.-C., Torbenson, M.S., Unalp-Arida, A., Yeh, M., McCullough, A.J., Sanyal, A.J., Nonalcoholic Steatohepatitis Clinical Research Network, 2005. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 41, 1313–1321. <https://doi.org/10.1002/hep.20701>
- Kloudova, A., Guengerich, F.P., Soucek, P., 2017. The Role of Oxysterols in Human Cancer. *Trends Endocrinol. Metab.* 28, 485–496. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2017.03.002>
- Koda, Y., Teratani, T., Chu, P.-S., Hagihara, Y., Mikami, Y., Harada, Y., Tsujikawa, H., Miyamoto, K., Suzuki, T., Taniki, N., Sujino, T., Sakamoto, M., Kanai, T., Nakamoto, N., 2021. CD8+ tissue-resident memory T cells promote liver fibrosis resolution by inducing apoptosis of hepatic stellate cells. *Nat. Commun.* 12, 4474. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-24734-0>
- Kohjima, M., Enjoji, M., Higuchi, N., Kato, M., Kotoh, K., Yoshimoto, T., Fujino, T., Yada, M., Yada, R., Harada, N., Takayanagi, R., Nakamuta, M., 2007. Re-evaluation of fatty acid metabolism-related gene expression in nonalcoholic fatty liver disease. *Int. J. Mol. Med.* <https://doi.org/10.3892/ijmm.20.3.351>
- Kolb, H., Kempf, K., Röhling, M., Lenzen-Schulte, M., Schloot, N.C., Martin, S., 2021. Ketone bodies: from enemy to friend and guardian angel. *BMC Med.* 19, 313. <https://doi.org/10.1186/s12916-021-02185-0>
- Koliaki, C., Szendroedi, J., Kaul, K., Jelenik, T., Nowotny, P., Jankowiak, F., Herder, C., Carstensen, M., Krausch, M., Knoefel, W.T., Schlensak, M., Roden, M., 2015. Adaptation of Hepatic Mitochondrial Function in Humans with Non-Alcoholic Fatty Liver Is Lost in Steatohepatitis. *Cell Metab.* 21, 739–746. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.04.004>
- Koo, S.-Y., Park, E.-J., Lee, C.-W., 2020. Immunological distinctions between nonalcoholic steatohepatitis and hepatocellular carcinoma. *Exp. Mol. Med.* 52, 1209–1219. <https://doi.org/10.1038/s12276-020-0480-3>
- Kotronen, A., Seppälä-Lindroos, A., Vehkavaara, S., Bergholm, R., Frayn, K.N., Fielding, B.A., Yki-Järvinen, H., 2009. Liver fat and lipid oxidation in humans. *Liver Int.* 29, 1439–1446. <https://doi.org/10.1111/j.1478-3231.2009.02076.x>
- Kozlitina, J., Smagris, E., Stender, S., Nordestgaard, B.G., Zhou, H.H., Tybjærg-Hansen, A., Vogt, T.F., Hobbs, H.H., Cohen, J.C., 2014. Exome-wide association study identifies a TM6SF2 variant that confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease. *Nat. Genet.* 46, 352–356. <https://doi.org/10.1038/ng.2901>
- Kraegen, E.W., Clark, P.W., Jenkins, A.B., Daley, E.A., Chisholm, D.J., Storlien, L.H., 1991. Development of Muscle Insulin Resistance After Liver Insulin Resistance in High-Fat-Fed Rats 40.

- Kremer, M., Thomas, E., Milton, R.J., Perry, A.W., Van Rooijen, N., Wheeler, M.D., Zacks, S., Fried, M., Rippe, R.A., Hines, I.N., 2010. Kupffer cell and interleukin-12-dependent loss of natural killer T cells in hepatosteatosis. *Hepatology* 51, 130–141. <https://doi.org/10.1002/hep.23292>
- Krenkel, O., Tacke, F., 2017. Liver macrophages in tissue homeostasis and disease. *Nat. Rev. Immunol.* 17, 306–321. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.11>
- Kreuz, S., Schoelch, C., Thomas, L., Rist, W., Rippmann, J.F., Neubauer, H., 2009. Acetyl-CoA carboxylases 1 and 2 show distinct expression patterns in rats and humans and alterations in obesity and diabetes. *Diabetes Metab. Res. Rev.* 25, 577–586. <https://doi.org/10.1002/dmrr.997>
- Kruepunga, N., Hakvoort, T.B.M., Hikspoors, J.P.J.M., Köhler, S.E., Lamers, W.H., 2019. Anatomy of rodent and human livers: What are the differences? *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis.* 1865, 869–878. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2018.05.019>
- Kulkarni, A.B., Karlsson, S., 1997. Inflammation and TGF β 1: lessons from the TGF β 1 null mouse. *Res. Immunol.* 148, 453–456.
- Kumarendran, B., O'Reilly, M.W., Manolopoulos, K.N., Toulis, K.A., Gokhale, K.M., Sitch, A.J., Wijeyaratne, C.N., Coomarasamy, A., Arlt, W., Nirantharakumar, K., 2018. Polycystic ovary syndrome, androgen excess, and the risk of nonalcoholic fatty liver disease in women: A longitudinal study based on a United Kingdom primary care database. *PLOS Med.* 15, e1002542. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1002542>
- Kumashiro, N., Erion, D.M., Zhang, D., Kahn, M., Beddow, S.A., Chu, X., Still, C.D., Gerhard, G.S., Han, X., Dziura, J., Petersen, K.F., Samuel, V.T., Shulman, G.I., 2011. Cellular mechanism of insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108, 16381–16385. <https://doi.org/10.1073/pnas.1113359108>
- Lackey, D.E., Olefsky, J.M., 2016. Regulation of metabolism by the innate immune system. *Nat. Rev. Endocrinol.* 12, 15–28. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2015.189>
- Laeger, T., Henagan, T.M., Albarado, D.C., Redman, L.M., Bray, G.A., Noland, R.C., Münzberg, H., Hutson, S.M., Gettys, T.W., Schwartz, M.W., Morrison, C.D., 2014. FGF21 is an endocrine signal of protein restriction. *J. Clin. Invest.* 124, 3913–3922. <https://doi.org/10.1172/JCI74915>
- Lai, K.K.Y., Kolippakkam, D., Beretta, L., 2008. Comprehensive and quantitative proteome profiling of the mouse liver and plasma. *Hepatology* 47, 1043–1051. <https://doi.org/10.1002/hep.22123>
- Lan, F., Misu, H., Chikamoto, K., Takayama, H., Kikuchi, A., Mohri, K., Takata, N., Hayashi, H., Matsuzawa-Nagata, N., Takeshita, Y., Noda, H., Matsumoto, Y., Ota, T., Nagano, T., Nakagen, M., Miyamoto, K., Takatsuki, K., Seo, T., Iwayama, K., Tokuyama, K., Matsugo, S., Tang, H., Saito, Y., Yamagoe, S., Kaneko, S., Takamura, T., 2014. LECT2 Functions as a Hepatokine That Links Obesity to Skeletal Muscle Insulin Resistance. *Diabetes* 63, 1649–1664. <https://doi.org/10.2337/db13-0728>
- Lan, T., Kisseleva, T., Brenner, D.A., 2015. Deficiency of NOX1 or NOX4 Prevents Liver Inflammation and Fibrosis in Mice through Inhibition of Hepatic Stellate Cell Activation. *PLOS ONE* 10, e0129743. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0129743>
- Lawitz, E.J., Coste, A., Poordad, F., Alkhouri, N., Loo, N., McColgan, B.J., Tarrant, J.M., Nguyen, T., Han, L., Chung, C., Ray, A.S., McHutchison, J.G., Subramanian, G.M., Myers, R.P., Middleton, M.S., Sirlin, C., Loomba, R., Nyangau, E., Fitch, M., Li, K., Hellerstein, M., 2018. Acetyl-CoA Carboxylase Inhibitor GS-0976 for 12 Weeks Reduces Hepatic De Novo Lipogenesis and Steatosis in Patients With Nonalcoholic Steatohepatitis. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 16, 1983–1991.e3. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2018.04.042>
- Leamy, A.K., Egnatchik, R.A., Shiota, M., Ivanova, P.T., Myers, D.S., Brown, H.A., Young, J.D., 2014. Enhanced synthesis of saturated phospholipids is associated with ER stress

- and lipotoxicity in palmitate treated hepatic cells. *J. Lipid Res.* 55, 1478–1488. <https://doi.org/10.1194/jlr.M050237>
- Leavens, K.F., Easton, R.M., Shulman, G.I., Previs, S.F., Birnbaum, M.J., 2009. Akt2 Is Required for Hepatic Lipid Accumulation in Models of Insulin Resistance. *Cell Metab.* 10, 405–418. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2009.10.004>
- Lebeaupin, C., Vallée, D., Hazari, Y., Hetz, C., Chevet, E., Bailly-Maitre, B., 2018. Endoplasmic reticulum stress signalling and the pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease. *J. Hepatol.* 69, 927–947. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2018.06.008>
- Lee, A.-H., Scapa, E.F., Cohen, D.E., Glimcher, L.H., 2008. Regulation of Hepatic Lipogenesis by the Transcription Factor XBP1. *Science* 320, 1492–1496. <https://doi.org/10.1126/science.1158042>
- Lee, J.N., Song, B., DeBose-Boyd, R.A., Ye, J., 2006. Sterol-regulated Degradation of Insig-1 Mediated by the Membrane-bound Ubiquitin Ligase gp78. *J. Biol. Chem.* 281, 39308–39315. <https://doi.org/10.1074/jbc.M608999200>
- Lee, J.Y., Moon, J.H., Park, J.S., Lee, B.-W., Kang, E.S., Ahn, C.W., Lee, H.C., Cha, B.S., 2011. Dietary Oleate Has Beneficial Effects on Every Step of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease Progression in a Methionine- and Choline-Deficient Diet-Fed Animal Model. *Diabetes Metab. J.* 35, 489. <https://doi.org/10.4093/dmj.2011.35.5.489>
- Lefebvre, P., Cariou, B., Lien, F., Kuipers, F., Staels, B., 2009. Role of Bile Acids and Bile Acid Receptors in Metabolic Regulation. *Physiol. Rev.* 89, 147–191. <https://doi.org/10.1152/physrev.00010.2008>
- L’Hermitte, A., Pham, S., Cadoux, M., Couchy, G., Caruso, S., Anson, M., Crain-Denoyelle, A.-M., Celton-Morizur, S., Yamagoe, S., Zucman-Rossi, J., Desdouets, C., Couty, J.-P., 2019. Lct2 Controls Inflammatory Monocytes to Constrain the Growth and Progression of Hepatocellular Carcinoma: Hepatobiliary Malignancies. *Hepatology* 69, 160–178. <https://doi.org/10.1002/hep.30140>
- Li, F., Jiang, C., Krausz, K.W., Li, Y., Albert, I., Hao, H., Fabre, K.M., Mitchell, J.B., Patterson, A.D., Gonzalez, F.J., 2013. Microbiome remodelling leads to inhibition of intestinal farnesoid X receptor signalling and decreased obesity. *Nat. Commun.* 4, 2384. <https://doi.org/10.1038/ncomms3384>
- Li, J., Zheng, X., Lou, N., Zhong, W., Yan, D., 2016. Oxysterol binding protein-related protein 8 mediates the cytotoxicity of 25-hydroxycholesterol. *J. Lipid Res.* 57, 1845–1853. <https://doi.org/10.1194/jlr.M069906>
- Li, M.V., Chang, B., Imamura, M., Pongvarin, N., Chan, L., 2006. Glucose-Dependent Transcriptional Regulation by an Evolutionarily Conserved Glucose-Sensing Module. *Diabetes* 55, 1179–1189. <https://doi.org/10.2337/db05-0822>
- Li, P., Spann, N.J., Kaikkonen, M.U., Lu, M., Oh, D.Y., Fox, J.N., Bandyopadhyay, G., Talukdar, S., Xu, J., Lagakos, W.S., Patsouris, D., Armando, A., Quehenberger, O., Dennis, E.A., Watkins, S.M., Auwerx, J., Glass, C.K., Olefsky, J.M., 2013. NCoR Repression of LXRs Restricts Macrophage Biosynthesis of Insulin-Sensitizing Omega 3 Fatty Acids. *Cell* 155, 200–214. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.08.054>
- Li, S., Brown, M.S., Goldstein, J.L., 2010. Bifurcation of insulin signaling pathway in rat liver: mTORC1 required for stimulation of lipogenesis, but not inhibition of gluconeogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107, 3441–3446. <https://doi.org/10.1073/pnas.0914798107>
- Li, X., Lin, P., Tao, Y., Jiang, X., Li, T., Wang, Y., Wang, C., Cao, Y., 2021. LECT 2 Antagonizes FOXM1 Signaling via Inhibiting MET to Retard PDAC Progression. *Front. Cell Dev. Biol.* 9, 661122. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.661122>
- Li, Y., Xu, S., Mihaylova, M.M., Zheng, B., Hou, X., Jiang, B., Park, O., Luo, Z., Lefai, E., Shyy, J.Y.-J., Gao, B., Wierzbicki, M., Verbeuren, T.J., Shaw, R.J., Cohen, R.A., Zang, M., 2011. AMPK Phosphorylates and Inhibits SREBP Activity to Attenuate Hepatic

- Steatosis and Atherosclerosis in Diet-Induced Insulin-Resistant Mice. *Cell Metab.* 13, 376–388. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.03.009>
- Li, Z.Z., Berk, M., McIntyre, T.M., Feldstein, A.E., 2009. Hepatic Lipid Partitioning and Liver Damage in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *J. Biol. Chem.* 284, 5637–5644. <https://doi.org/10.1074/jbc.M807616200>
- Liang, G., Yang, J., Horton, J.D., Hammer, R.E., Goldstein, J.L., Brown, M.S., 2002. Diminished Hepatic Response to Fasting/Refeeding and Liver X Receptor Agonists in Mice with Selective Deficiency of Sterol Regulatory Element-binding Protein-1c. *J. Biol. Chem.* 277, 9520–9528. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111421200>
- Li-Hawkins, J., Lund, E.G., Turley, S.D., Russell, D.W., 2000. Disruption of the Oxysterol 7 α -Hydroxylase Gene in Mice. *J. Biol. Chem.* 275, 16536–16542. <https://doi.org/10.1074/jbc.M001811200>
- Lima-Cabello, E., García-Mediavilla, M.V., Miquilena-Colina, M.E., Vargas-Castrillón, J., Lozano-Rodríguez, T., Fernández-Bermejo, M., Olcoz, J.L., González-Gallego, J., García-Monzón, C., Sánchez-Campos, S., 2011. Enhanced expression of pro-inflammatory mediators and liver X-receptor-regulated lipogenic genes in non-alcoholic fatty liver disease and hepatitis C. *Clin. Sci.* 120, 239–250. <https://doi.org/10.1042/CS20100387>
- Lindenmeyer, C.C., McCullough, A.J., 2018. The Natural History of Nonalcoholic Fatty Liver Disease—An Evolving View. *Clin. Liver Dis.* 22, 11–21. <https://doi.org/10.1016/j.cld.2017.08.003>
- Listenberger, L.L., Han, X., Lewis, S.E., Cases, S., Farese, R.V., Ory, D.S., Schaffer, J.E., 2003. Triglyceride accumulation protects against fatty acid-induced lipotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100, 3077–3082. <https://doi.org/10.1073/pnas.0630588100>
- Litwack, G., 2018a. Glycolysis and Gluconeogenesis, in: *Human Biochemistry*. Elsevier, pp. 183–198. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-383864-3.00008-9>
- Litwack, G., 2018b. Lipids, in: *Human Biochemistry*. Elsevier, pp. 199–255. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-383864-3.00009-0>
- Liu, D., Wong, C.C., Fu, L., Chen, H., Zhao, L., Li, C., Zhou, Y., Zhang, Y., Xu, W., Yang, Y., Wu, B., Cheng, G., Lai, P.B.-S., Wong, N., Sung, J.J.Y., Yu, J., 2018. Squalene epoxidase drives NAFLD-induced hepatocellular carcinoma and is a pharmaceutical target. *Sci. Transl. Med.* 10, eaap9840. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aap9840>
- Liu, Y., Han, X., Bian, Z., Peng, Y., You, Z., Wang, Q., Chen, X., Qiu, D., Ma, X., 2012. Activation of Liver X Receptors Attenuates Endotoxin-Induced Liver Injury in Mice with Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Dig. Dis. Sci.* 57, 390–398. <https://doi.org/10.1007/s10620-011-1902-9>
- Liu, Y., Wei, Z., Ma, X., Yang, X., Chen, Y., Sun, L., Ma, C., Miao, Q.R., Hajjar, D.P., Han, J., Duan, Y., 2018. 25-Hydroxycholesterol activates the expression of cholesterol 25-hydroxylase in an LXR-dependent mechanism. *J. Lipid Res.* 59, 439–451. <https://doi.org/10.1194/jlr.M080440>
- Llovet, J.M., Kelley, R.K., Villanueva, A., Singal, A.G., Pikarsky, E., Roayaie, S., Lencioni, R., Koike, K., Zucman-Rossi, J., Finn, R.S., 2021. Hepatocellular carcinoma. *Nat. Rev. Dis. Primer* 7, 6. <https://doi.org/10.1038/s41572-020-00240-3>
- Lodhi, I.J., Wei, X., Semenkovich, C.F., 2011. Lipoexpediency: de novo lipogenesis as a metabolic signal transmitter. *Trends Endocrinol. Metab.* 22, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2010.09.002>
- Loomba, R., Friedman, S.L., Shulman, G.I., 2021a. Mechanisms and disease consequences of nonalcoholic fatty liver disease. *Cell* 184, 2537–2564. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.04.015>
- Loomba, R., Mohseni, R., Lucas, K.J., Gutierrez, J.A., Perry, R.G., Trotter, J.F., Rahimi, R.S., Harrison, S.A., Ajmera, V., Wayne, J.D., O'Farrell, M., McCulloch, W., Grimmer, K.,

- Rinella, M., Wai-Sun Wong, V., Ratzliff, V., Gores, G.J., Neuschwander-Tetri, B.A., Kemble, G., 2021b. TVB-2640 (FASN Inhibitor) for the Treatment of Nonalcoholic Steatohepatitis: FASCINATE-1, a Randomized, Placebo-Controlled Phase 2a Trial. *Gastroenterology* 161, 1475–1486. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2021.07.025>
- Lu, X.-J., Chen, J., Yu, C.-H., Shi, Y.-H., He, Y.-Q., Zhang, R.-C., Huang, Z.-A., Lv, J.-N., Zhang, S., Xu, L., 2013. LECT2 protects mice against bacterial sepsis by activating macrophages via the CD209a receptor. *J. Exp. Med.* 210, 5–13. <https://doi.org/10.1084/jem.20121466>
- Lu, X.-J., Chen, Q., Rong, Y.-J., Yang, G.-J., Li, C.-H., Xu, N.-Y., Yu, C.-H., Wang, H.-Y., Zhang, S., Shi, Y.-H., Chen, J., 2016. LECT2 drives haematopoietic stem cell expansion and mobilization via regulating the macrophages and osteolineage cells. *Nat. Commun.* 7, 12719. <https://doi.org/10.1038/ncomms12719>
- Ludwig, J., Viggiano, T., McGill, D., Oh, B., 1980. Nonalcoholic steatohepatitis: Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease. *Mayo Clin. Proc.* 55, 434–442. <https://doi.org/7382552>
- Lundsgaard, A.-M., Fritzen, A.M., Sjøberg, K.A., Myrmet, L.S., Madsen, L., Wojtaszewski, J.F.P., Richter, E.A., Kiens, B., 2017. Circulating FGF21 in humans is potently induced by short term overfeeding of carbohydrates. *Mol. Metab.* 6, 22–29. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2016.11.001>
- Luo, F., Oldoni, F., Das, A., 2022. TM6SF2: A Novel Genetic Player in Nonalcoholic Fatty Liver and Cardiovascular Disease. *Hepatol. Commun.* 6, 448–460. <https://doi.org/10.1002/hep4.1822>
- Luo, J., Yang, H., Song, B.-L., 2020. Mechanisms and regulation of cholesterol homeostasis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 21, 225–245. <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0190-7>
- Lytle, K.A., Bush, N.C., Triay, J.M., Kellogg, T.A., Kendrick, M.L., Swain, J.M., Gathaiya, N.W., Hames, K.C., Jensen, M.D., 2019. Hepatic Fatty Acid Balance and Hepatic Fat Content in Humans With Severe Obesity. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 104, 6171–6181. <https://doi.org/10.1210/jc.2019-00875>
- Ma, C., Kesarwala, A.H., Eggert, T., Medina-Echeverz, J., Kleiner, D.E., Jin, P., Stronck, D.F., Terabe, M., Kapoor, V., ElGindi, M., Han, M., Thornton, A.M., Zhang, H., Egger, M., Luo, J., Felsher, D.W., McVicar, D.W., Weber, A., Heikenwalder, M., Greten, T.F., 2016. NAFLD causes selective CD4+ T lymphocyte loss and promotes hepatocarcinogenesis. *Nature* 531, 253–257. <https://doi.org/10.1038/nature16969>
- Ma, H.-L., Shi, Y.-H., Zhang, X.-H., Li, M.-Y., Chen, J., 2016. A transmembrane C-type lectin receptor mediates LECT2 effects on head kidney-derived monocytes/macrophages in a teleost, *Plecoglossus altivelis*. *Fish Shellfish Immunol.* 51, 70–76. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.02.013>
- Ma, X., Hua, J., Mohamood, A.R., Hamad, A.R.A., Ravi, R., Li, Z., 2007. A high-fat diet and regulatory T cells influence susceptibility to endotoxin-induced liver injury. *Hepatology* 46, 1519–1529. <https://doi.org/10.1002/hep.21823>
- Madenspacher, J.H., Morrell, E.D., Gowdy, K.M., McDonald, J.G., Thompson, B.M., Muse, G.W., Martinez, J., Thomas, S.Y., Mikacenic, C., Nick, J.A., Abraham, E., Garantzotis, S., Stapleton, R.D., Meacham, J.M., Thomassen, M.J., Janssen, W.J., Cook, D.N., Wurfel, M.M., Fessler, M.B., 2020. Cholesterol-25-hydroxylase promotes efferocytosis and resolution of lung inflammation. *JCI Insight.* <https://doi.org/10.1172/jci.insight.137189>
- Maeda, N., Shimomura, I., Kishida, K., Nishizawa, H., Matsuda, M., Nagaretani, H., Furuyama, N., Kondo, H., Takahashi, M., Arita, Y., Komuro, R., Ouchi, N., Kihara, S., Tochino, Y., Okutomi, K., Horie, M., Takeda, S., Aoyama, T., Funahashi, T., Matsuzawa, Y., 2002. Diet-induced insulin resistance in mice lacking adiponectin/ACRP30. *Nat. Med.* 8, 731–737. <https://doi.org/10.1038/nm724>

- Mahdessian, H., Taxiarchis, A., Popov, S., Silveira, A., Franco-Cereceda, A., Hamsten, A., Eriksson, P., Van'T Hooft, F., 2014. TM6SF2 is a regulator of liver fat metabolism influencing triglyceride secretion and hepatic lipid droplet content. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111, 8913–8918. <https://doi.org/10.1073/pnas.1323785111>
- Malhi, H., Barreyro, F.J., Isomoto, H., Bronk, S.F., Gores, G.J., 2007. Free fatty acids sensitise hepatocytes to TRAIL mediated cytotoxicity. *Gut* 56, 1124–1131. <https://doi.org/10.1136/gut.2006.118059>
- Malhi, H., Bronk, S.F., Werneburg, N.W., Gores, G.J., 2006. Free Fatty Acids Induce JNK-dependent Hepatocyte Lipoapoptosis. *J. Biol. Chem.* 281, 12093–12101. <https://doi.org/10.1074/jbc.M510660200>
- Manna, P.R., Dyson, M.T., Stocco, D.M., 2009. Regulation of the steroidogenic acute regulatory protein gene expression: present and future perspectives. *Mol. Hum. Reprod.* 15, 321–333. <https://doi.org/10.1093/molehr/gap025>
- Mao, J., DeMayo, F.J., Li, H., Abu-Elheiga, L., Gu, Z., Shaikenov, T.E., Kordari, P., Chirala, S.S., Heird, W.C., Wakil, S.J., 2006. Liver-specific deletion of acetyl-CoA carboxylase 1 reduces hepatic triglyceride accumulation without affecting glucose homeostasis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103, 8552–8557. <https://doi.org/10.1073/pnas.0603115103>
- Maretti-Mira, A.C., Wang, X., Wang, L., DeLeve, L.D., 2019. Incomplete Differentiation of Engrafted Bone Marrow Endothelial Progenitor Cells Initiates Hepatic Fibrosis in the Rat. *Hepatology* 69, 1259–1272. <https://doi.org/10.1002/hep.30227>
- Marí, M., Caballero, F., Colell, A., Morales, A., Caballeria, J., Fernandez, A., Enrich, C., Fernandez-Checa, J.C., García-Ruiz, C., 2006. Mitochondrial free cholesterol loading sensitizes to TNF- and Fas-mediated steatohepatitis. *Cell Metab.* 4, 185–198. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2006.07.006>
- Maricic, I., Marrero, I., Eguchi, A., Nakamura, R., Johnson, C.D., Dasgupta, S., Hernandez, C.D., Nguyen, P.S., Swafford, A.D., Knight, R., Feldstein, A.E., Loomba, R., Kumar, V., 2018. Differential Activation of Hepatic Invariant NKT Cell Subsets Plays a Key Role in Progression of Nonalcoholic Steatohepatitis. *J. Immunol.* 201, 3017–3035. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1800614>
- Marra, F., Svegliati-Baroni, G., 2018. Lipotoxicity and the gut-liver axis in NASH pathogenesis. *J. Hepatol.* 68, 280–295. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2017.11.014>
- Martínez-Chantar, M.L., Delgado, T.C., Beraza, N., 2021. Revisiting the Role of Natural Killer Cells in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Front. Immunol.* 12, 640869. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.640869>
- Martínez-Reyes, I., Chandel, N.S., 2020. Mitochondrial TCA cycle metabolites control physiology and disease. *Nat. Commun.* 11, 102. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13668-3>
- Mass, E., Ballesteros, I., Farlik, M., Halbritter, F., Günther, P., Crozet, L., Jacome-Galarza, C.E., Händler, K., Klughammer, J., Kobayashi, Y., Gomez-Perdiguerro, E., Schultze, J.L., Beyer, M., Bock, C., Geissmann, F., 2016. Specification of tissue-resident macrophages during organogenesis. *Science* 353, aaf4238. <https://doi.org/10.1126/science.aaf4238>
- Mathews, S.T., Singh, G.P., Ranalletta, M., Cintron, V.J., Qiang, X., Goustin, A.S., Jen, K.-L.C., Charron, M.J., Jahnen-Dechent, W., Grunberger, G., 2002. Improved Insulin Sensitivity and Resistance to Weight Gain in Mice Null for the *Ahsg* Gene. *Diabetes* 51, 2450–2458. <https://doi.org/10.2337/diabetes.51.8.2450>
- Matsuda, M., Korn, B.S., Hammer, R.E., Moon, Y.-A., Komuro, R., Horton, J.D., Goldstein, J.L., Brown, M.S., Shimomura, I., 2001. SREBP cleavage-activating protein (SCAP) is required for increased lipid synthesis in liver induced by cholesterol deprivation and insulin elevation. *Genes Dev.* 15, 1206–1216. <https://doi.org/10.1101/gad.891301>

- Matsuzaka, T., Shimano, H., Yahagi, N., Kato, T., Atsumi, A., Yamamoto, T., Inoue, N., Ishikawa, M., Okada, S., Ishigaki, N., Iwasaki, H., Iwasaki, Y., Karasawa, T., Kumadaki, S., Matsui, T., Sekiya, M., Ohashi, K., Hasty, A.H., Nakagawa, Y., Takahashi, A., Suzuki, H., Yatoh, S., Sone, H., Toyoshima, H., Osuga, J., Yamada, N., 2007. Crucial role of a long-chain fatty acid elongase, Elovl6, in obesity-induced insulin resistance. *Nat. Med.* 13, 1193–1202. <https://doi.org/10.1038/nm1662>
- Matthew Morris, E., Jackman, M.R., Johnson, G.C., Liu, T.-W., Lopez, J.L., Kearney, M.L., Fletcher, J.A., Meers, G.M.E., Koch, L.G., Britton, S.L., Scott Rector, R., Ibdah, J.A., MacLean, P.S., Thyfault, J.P., 2014. Intrinsic aerobic capacity impacts susceptibility to acute high-fat diet-induced hepatic steatosis. *Am. J. Physiol.-Endocrinol. Metab.* 307, E355–E364. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00093.2014>
- McFerrin, L.G., Atchley, W.R., 2012. A Novel N-Terminal Domain May Dictate the Glucose Response of Mondo Proteins. *PLoS ONE* 7, e34803. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034803>
- McPherson, S., Hardy, T., Henderson, E., Burt, A.D., Day, C.P., Anstee, Q.M., 2015. Evidence of NAFLD progression from steatosis to fibrosing-steatohepatitis using paired biopsies: Implications for prognosis and clinical management. *J. Hepatol.* 62, 1148–1155. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2014.11.034>
- Meex, R.C., Hoy, A.J., Morris, A., Brown, R.D., Lo, J.C.Y., Burke, M., Goode, R.J.A., Kingwell, B.A., Kraakman, M.J., Febbraio, M.A., Greve, J.W., Rensen, S.S., Molloy, M.P., Lancaster, G.I., Bruce, C.R., Watt, M.J., 2015. Fetuin B Is a Secreted Hepatocyte Factor Linking Steatosis to Impaired Glucose Metabolism. *Cell Metab.* 22, 1078–1089. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.09.023>
- Meex, R.C.R., Watt, M.J., 2017. Hepatokines: linking nonalcoholic fatty liver disease and insulin resistance. *Nat. Rev. Endocrinol.* 13, 509–520. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2017.56>
- Meier, J.J., 2016. Insulin Secretion, in: *Endocrinology: Adult and Pediatric*. Elsevier, pp. 546–555.e5. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-18907-1.00032-9>
- Meng, F., Wang, K., Aoyama, T., Grivennikov, S.I., Paik, Y., Scholten, D., Cong, M., Iwaisako, K., Liu, X., Zhang, M., Österreicher, C.H., Stickel, F., Ley, K., Brenner, D.A., Kisseleva, T., 2012. Interleukin-17 Signaling in Inflammatory, Kupffer Cells, and Hepatic Stellate Cells Exacerbates Liver Fibrosis in Mice. *Gastroenterology* 143, 765–776.e3. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2012.05.049>
- Michael, M.D., Kulkarni, R.N., Postic, C., Previs, S.F., Shulman, G.I., Magnuson, M.A., Kahn, C.R., 2000. Loss of Insulin Signaling in Hepatocytes Leads to Severe Insulin Resistance and Progressive Hepatic Dysfunction. *Mol. Cell* 6, 87–97.
- Michelet, X., Dyck, L., Hogan, A., Loftus, R.M., Duquette, D., Wei, K., Beyaz, S., Tavakkoli, A., Foley, C., Donnelly, R., O’Farrelly, C., Raverdeau, M., Vernon, A., Pettee, W., O’Shea, D., Nikolajczyk, B.S., Mills, K.H.G., Brenner, M.B., Finlay, D., Lynch, L., 2018. Metabolic reprogramming of natural killer cells in obesity limits antitumor responses. *Nat. Immunol.* 19, 1330–1340. <https://doi.org/10.1038/s41590-018-0251-7>
- Minehira, K., Young, S.G., Villanueva, C.J., Yetukuri, L., Oresic, M., Hellerstein, M.K., Farese, R.V., Horton, J.D., Preitner, F., Thorens, B., Tappy, L., 2008. Blocking VLDL secretion causes hepatic steatosis but does not affect peripheral lipid stores or insulin sensitivity in mice. *J. Lipid Res.* 49, 2038–2044. <https://doi.org/10.1194/jlr.M800248-JLR200>
- Monetti, M., Levin, M.C., Watt, M.J., Sajan, M.P., Marmor, S., Hubbard, B.K., Stevens, R.D., Bain, J.R., Newgard, C.B., Farese, R.V., Hevener, A.L., Farese, R.V., 2007. Dissociation of Hepatic Steatosis and Insulin Resistance in Mice Overexpressing DGAT in the Liver. *Cell Metab.* 6, 69–78. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2007.05.005>

- Montagner, A., Polizzi, A., Fouché, E., Ducheix, S., Lippi, Y., Lasserre, F., Barquissau, V., Régnier, M., Lukowicz, C., Benhamed, F., Iroz, A., Bertrand-Michel, J., Al Saati, T., Cano, P., Mselli-Lakhal, L., Mithieux, G., Rajas, F., Lagarrigue, S., Pineau, T., Loiseau, N., Postic, C., Langin, D., Wahli, W., Guillou, H., 2016. Liver PPAR α is crucial for whole-body fatty acid homeostasis and is protective against NAFLD. *Gut* 65, 1202–1214. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2015-310798>
- Moon, Y.-A., Hammer, R.E., Horton, J.D., 2009. Deletion of ELOVL5 leads to fatty liver through activation of SREBP-1c in mice. *J. Lipid Res.* 50, 412–423. <https://doi.org/10.1194/jlr.M800383-JLR200>
- Moon, Y.-A., Ochoa, C.R., Mitsche, M.A., Hammer, R.E., Horton, J.D., 2014. Deletion of ELOVL6 blocks the synthesis of oleic acid but does not prevent the development of fatty liver or insulin resistance. *J. Lipid Res.* 55, 2597–2605. <https://doi.org/10.1194/jlr.M054353>
- Morral, N., Edenberg, H.J., Witting, S.R., Altomonte, J., Chu, T., Brown, M., 2007. Effects of glucose metabolism on the regulation of genes of fatty acid synthesis and triglyceride secretion in the liver. *J. Lipid Res.* 48, 1499–1510. <https://doi.org/10.1194/jlr.M700090-JLR200>
- Mudaliar, S., Henry, R.R., Sanyal, A.J., Morrow, L., Marschall, H., Kipnes, M., Adorini, L., Sciacca, C.I., Clopton, P., Castelloe, E., Dillon, P., Pruzanski, M., Shapiro, D., 2013. Efficacy and Safety of the Farnesoid X Receptor Agonist Obeticholic Acid in Patients With Type 2 Diabetes and Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology* 145, 574-582.e1. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2013.05.042>
- Nakagawa, H., Umemura, A., Taniguchi, K., Font-Burgada, J., Dhar, D., Ogata, H., Zhong, Z., Valasek, M.A., Seki, E., Hidalgo, J., Koike, K., Kaufman, R.J., Karin, M., 2014. ER Stress Cooperates with Hypernutrition to Trigger TNF-Dependent Spontaneous HCC Development. *Cancer Cell* 26, 331–343. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2014.07.001>
- Nakagawa, T., Ge, Q., Pawlosky, R., Wynn, R.M., Veech, R.L., Uyeda, K., 2013. Metabolite Regulation of Nucleo-cytosolic Trafficking of Carbohydrate Response Element-binding Protein (ChREBP). *J. Biol. Chem.* 288, 28358–28367. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.498550>
- Neuschwander-Tetri, B.A., Loomba, R., Sanyal, A.J., Lavine, J.E., Van Natta, M.L., Abdelmalek, M.F., Chalasani, N., Dasarathy, S., Diehl, A.M., Hameed, B., Kowdley, K.V., McCullough, A., Terrault, N., Clark, J.M., Tonascia, J., Brunt, E.M., Kleiner, D.E., Doo, E., 2015. Farnesoid X nuclear receptor ligand obeticholic acid for non-cirrhotic, non-alcoholic steatohepatitis (FLINT): a multicentre, randomised, placebo-controlled trial. *The Lancet* 385, 956–965. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)61933-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)61933-4)
- Nishida, N., Yada, N., Hagiwara, S., Sakurai, T., Kitano, M., Kudo, M., 2016. Unique features associated with hepatic oxidative DNA damage and DNA methylation in non-alcoholic fatty liver disease: DNA oxidation and methylation in NAFLD. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 31, 1646–1653. <https://doi.org/10.1111/jgh.13318>
- Nishimura, T., Nakatake, Y., Konishi, M., Itoh, N., 2000. Identification of a novel FGF, FGF-21, preferentially expressed in the liver. *Biochim. Biophys. Acta* 1492, 203–206.
- Northrop, A., Byers, H.A., Radhakrishnan, S.K., 2020. Regulation of NRF1, a master transcription factor of proteasome genes: implications for cancer and neurodegeneration. *Mol. Biol. Cell* 31, 2158–2163. <https://doi.org/10.1091/mbc.E20-04-0238>
- Okabe, H., Delgado, E., Lee, J.M., Yang, J., Kinoshita, H., Hayashi, H., Tsung, A., Behari, J., Beppu, T., Baba, H., Monga, S.P., 2014. Role of Leukocyte Cell-Derived Chemotaxin 2 as a Biomarker in Hepatocellular Carcinoma. *PLoS ONE* 9, e98817. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0098817>

- Okumura, A., Saito, T., Otani, I., Kojima, K., Yamada, Y., Ishida-Okawara, A., Nakazato, K., Asano, M., Kanayama, K., Iwakura, Y., Suzuki, K., Yamagoe, S., 2008. Suppressive role of leukocyte cell-derived chemotaxin 2 in mouse anti-type II collagen antibody-induced arthritis. *Arthritis Rheum.* 58, 413–421. <https://doi.org/10.1002/art.23215>
- Okumura, A., Suzuki, T., Dohmae, N., Okabe, T., Hashimoto, Y., Nakazato, K., Ohno, H., Miyazaki, Y., Yamagoe, S., 2009. Identification and assignment of three disulfide bonds in mammalian leukocyte cell-derived chemotaxin 2 by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Biosci. Trends* 3, 139–143.
- Okumura, A., Suzuki, T., Miyatake, H., Okabe, T., Hashimoto, Y., Miyakawa, T., Zheng, H., Unoki-Kubota, H., Ohno, H., Dohmae, N., Kaburagi, Y., Miyazaki, Y., Tanokura, M., Yamagoe, S., 2013a. Leukocyte cell-derived chemotaxin 2 is a zinc-binding protein. *FEBS Lett.* 587, 404–409. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2013.01.025>
- Okumura, A., Unoki-Kubota, H., Matsushita, Y., Shiga, T., Moriyoshi, Y., Yamagoe, S., Kaburagi, Y., 2013b. Increased serum leukocyte cell-derived chemotaxin 2 (LECT2) levels in obesity and fatty liver. *Biosci. Trends* 7. <https://doi.org/10.5582/bst.2013.v7.6.276>
- Ong, H.T., Tan, P.K., Wang, S.M., Hian Low, D.T., PJ Ooi, L.L., Hui, K.M., 2011. The tumor suppressor function of LECT2 in human hepatocellular carcinoma makes it a potential therapeutic target. *Cancer Gene Ther.* 18, 399–406. <https://doi.org/10.1038/cgt.2011.5>
- Ortega-Prieto, P., Postic, C., 2019. Carbohydrate Sensing Through the Transcription Factor ChREBP. *Front. Genet.* 10, 472. <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00472>
- Ouweneel, A.B., Thomas, M.J., Sorci-Thomas, M.G., 2020. The ins and outs of lipid rafts: functions in intracellular cholesterol homeostasis, microparticles, and cell membranes. *J. Lipid Res.* 61, 676–686. <https://doi.org/10.1194/jlr.TR119000383>
- Ouyang, G., Yi, B., Pan, G., Chen, X., 2020. A robust twelve-gene signature for prognosis prediction of hepatocellular carcinoma. *Cancer Cell Int.* 20, 207. <https://doi.org/10.1186/s12935-020-01294-9>
- Ovejero, C., Cavard, C., Périanin, A., Hakvoort, T., Vermeulen, J., Godard, C., Fabre, M., Chafey, P., Suzuki, K., Romagnolo, B., Yamagoe, S., Perret, C., 2004. Identification of the leukocyte cell-derived chemotaxin 2 as a direct target gene of β -catenin in the liver. *Hepatology* 40, 167–176. <https://doi.org/10.1002/hep.20286>
- Owen, J.L., Zhang, Y., Bae, S.-H., Farooqi, M.S., Liang, G., Hammer, R.E., Goldstein, J.L., Brown, M.S., 2012. Insulin stimulation of SREBP-1c processing in transgenic rat hepatocytes requires p70 S6-kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, 16184–16189. <https://doi.org/10.1073/pnas.1213343109>
- Özcan, U., Cao, Q., Yilmaz, E., Lee, A.-H., Iwakoshi, N.N., Özdelen, E., Tuncman, G., Görgün, C., Glimcher, L.H., Hotamisligil, G.S., 2004. Endoplasmic Reticulum Stress Links Obesity, Insulin Action, and Type 2 Diabetes. *Science* 306, 457–461. <https://doi.org/10.1126/science.1103160>
- Pal, D., Dasgupta, S., Kundu, R., Maitra, S., Das, G., Mukhopadhyay, S., Ray, S., Majumdar, S.S., Bhattacharya, S., 2012. Fetuin-A acts as an endogenous ligand of TLR4 to promote lipid-induced insulin resistance. *Nat. Med.* 18, 1279–1285. <https://doi.org/10.1038/nm.2851>
- Paniagua, J.A., De La Sacristana, A.G., Sánchez, E., Romero, I., Vidal-Puig, A., Berral, F.J., Escribano, A., Moyano, M.J., Pérez-Martínez, P., López-Miranda, J., Pérez-Jiménez, F., 2007. A MUFA-Rich Diet Improves Postprandial Glucose, Lipid and GLP-1 Responses in Insulin-Resistant Subjects. *J. Am. Coll. Nutr.* 26, 434–444. <https://doi.org/10.1080/07315724.2007.10719633>
- Paradis, V., Zalinski, S., Chelbi, E., Guedj, N., Degos, F., Vilgrain, V., Bedossa, P., Belghiti, J., 2009. Hepatocellular carcinomas in patients with metabolic syndrome often develop

- without significant liver fibrosis: A pathological analysis. *Hepatology* 49, 851–859. <https://doi.org/10.1002/hep.22734>
- Park, E.J., Lee, J.H., Yu, G.-Y., He, G., Ali, S.R., Holzer, R.G., Österreicher, C.H., Takahashi, H., Karin, M., 2010. Dietary and Genetic Obesity Promote Liver Inflammation and Tumorigenesis by Enhancing IL-6 and TNF Expression. *Cell* 140, 197–208. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.12.052>
- Parséus, A., Sommer, N., Sommer, F., Caesar, R., Molinaro, A., Ståhlman, M., Greiner, T.U., Perkins, R., Bäckhed, F., 2017. Microbiota-induced obesity requires farnesoid X receptor. *Gut* 66, 429–437. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2015-310283>
- Patel, K., Harrison, S.A., Elkhatab, M., Trotter, J.F., Herring, R., Rojter, S.E., Kayali, Z., Wong, V.W., Greenbloom, S., Jayakumar, S., Shiffman, M.L., Freilich, B., Lawitz, E.J., Gane, E.J., Harting, E., Xu, J., Billin, A.N., Chung, C., Djedjos, C.S., Subramanian, G.M., Myers, R.P., Middleton, M.S., Rinella, M., Noureddin, M., 2020. Cilofexor, a Nonsteroidal FXR Agonist, in Patients With Noncirrhotic NASH: A Phase 2 Randomized Controlled Trial. *Hepatology* 72, 58–71. <https://doi.org/10.1002/hep.31205>
- Pawlak, M., Lefebvre, P., Staels, B., 2015. Molecular mechanism of PPAR α action and its impact on lipid metabolism, inflammation and fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease. *J. Hepatol.* 62, 720–733. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2014.10.039>
- Peet, D.J., Turley, S.D., Ma, W., Janowski, B.A., Lobaccaro, J.-M.A., Hammer, R.E., Mangelsdorf, D.J., 1998. Cholesterol and Bile Acid Metabolism Are Impaired in Mice Lacking the Nuclear Oxysterol Receptor LXRA. *Cell* 93, 693–704. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81432-4](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81432-4)
- Peiseler, M., Schwabe, R., Hampe, J., Kubes, P., Heikenwälder, M., Tacke, F., 2022. Immune mechanisms linking metabolic injury to inflammation and fibrosis in fatty liver disease – novel insights into cellular communication circuits. *J. Hepatol.* 77, 1136–1160. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2022.06.012>
- Pendyala, S., Walker, J.M., Holt, P.R., 2012. A High-Fat Diet Is Associated With Endotoxemia That Originates From the Gut. *Gastroenterology* 142, 1100-1101.e2. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2012.01.034>
- Pérez-Carreras, M., Del Hoyo, P., Martín, M.A., Rubio, J.C., Martín, A., Castellano, G., Colina, F., Arenas, J., Solis-Herruzo, J.A., 2003. Defective hepatic mitochondrial respiratory chain in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 38, 999–1007. <https://doi.org/10.1002/hep.1840380426>
- Perry, R.J., Samuel, V.T., Petersen, K.F., Shulman, G.I., 2014. The role of hepatic lipids in hepatic insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature* 510, 84–91. <https://doi.org/10.1038/nature13478>
- Petersen, K.F., Oral, E.A., Dufour, S., Befroy, D., Ariyan, C., Yu, C., Cline, G.W., DePaoli, A.M., Taylor, S.I., Gorden, P., Shulman, G.I., 2002. Leptin reverses insulin resistance and hepatic steatosis in patients with severe lipodystrophy. *J. Clin. Invest.* 109, 1345–1350. <https://doi.org/10.1172/JCI0215001>
- Petersen, M.C., Shulman, G.I., 2018. Mechanisms of Insulin Action and Insulin Resistance. *Physiol. Rev.* 98, 2133–2223. <https://doi.org/10.1152/physrev.00063.2017>
- Petersen, M.C., Vatner, D.F., Shulman, G.I., 2017. Regulation of hepatic glucose metabolism in health and disease. *Nat. Rev. Endocrinol.* 13, 572–587. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2017.80>
- Peterson, T.R., Sengupta, S.S., Harris, T.E., Carmack, A.E., Kang, S.A., Balderas, E., Guertin, D.A., Madden, K.L., Carpenter, A.E., Finck, B.N., Sabatini, D.M., 2011. mTOR Complex 1 Regulates Lipin 1 Localization to Control the SREBP Pathway. *Cell* 146, 408–420. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.06.034>

- Phesse, T.J., Parry, L., Reed, K.R., Ewan, K.B., Dale, T.C., Sansom, O.J., Clarke, A.R., 2008. Deficiency of Mbd2 Attenuates Wnt Signaling. *Mol. Cell. Biol.* 28, 6094–6103. <https://doi.org/10.1128/MCB.00539-08>
- Pineda Torra, I., Claudel, T., Duval, C., Kosykh, V., Fruchart, J.-C., Staels, B., 2003. Bile Acids Induce the Expression of the Human Peroxisome Proliferator-Activated Receptor α Gene via Activation of the Farnesoid X Receptor. *Mol. Endocrinol.* 17, 259–272. <https://doi.org/10.1210/me.2002-0120>
- Poupeau, A., Postic, C., 2011. Cross-regulation of hepatic glucose metabolism via ChREBP and nuclear receptors. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis.* 1812, 995–1006. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2011.03.015>
- Powell, D.J., Hajdуч, E., Kular, G., Hundal, H.S., 2003. Ceramide Disables 3-Phosphoinositide Binding to the Pleckstrin Homology Domain of Protein Kinase B (PKB)/Akt by a PKC δ -Dependent Mechanism. *MOL CELL BIOL* 23.
- Puri, P., Baillie, R.A., Wiest, M.M., Mirshahi, F., Choudhury, J., Cheung, O., Sargeant, C., Contos, M.J., Sanyal, A.J., 2007. A lipidomic analysis of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 46, 1081–1090. <https://doi.org/10.1002/hep.21763>
- Puri, P., Daita, K., Joyce, A., Mirshahi, F., Santhekadur, P.K., Cazanave, S., Luketic, V.A., Siddiqui, M.S., Boyett, S., Min, H., Kumar, D.P., Kohli, R., Zhou, H., Hylemon, P.B., Contos, M.J., Idowu, M., Sanyal, A.J., 2018. The presence and severity of nonalcoholic steatohepatitis is associated with specific changes in circulating bile acids. *Hepatology* 67, 534–548. <https://doi.org/10.1002/hep.29359>
- Raddatz, K., Turner, N., Frangioudakis, G., Liao, B.M., Pedersen, D.J., Cantley, J., Wilks, D., Preston, E., Hegarty, B.D., Leitges, M., Raftery, M.J., Biden, T.J., Schmitz-Peiffer, C., 2011. Time-dependent effects of Prkce deletion on glucose homeostasis and hepatic lipid metabolism on dietary lipid oversupply in mice. *Diabetologia* 54, 1447–1456. <https://doi.org/10.1007/s00125-011-2073-0>
- Radhakrishnan, A., Ikeda, Y., Kwon, H.J., Brown, M.S., Goldstein, J.L., 2007. Sterol-regulated transport of SREBPs from endoplasmic reticulum to Golgi: Oxysterols block transport by binding to Insig. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104, 6511–6518. <https://doi.org/10.1073/pnas.0700899104>
- Raimondo, A., Rees, M.G., Gloyn, A.L., 2015. Glucokinase regulatory protein: complexity at the crossroads of triglyceride and glucose metabolism. *Curr. Opin. Lipidol.* 26, 88–95. <https://doi.org/10.1097/MOL.0000000000000155>
- Ramachandran, P., Dobbie, R., Wilson-Kanamori, J.R., Dora, E.F., Henderson, B.E.P., Luu, N.T., Portman, J.R., Matchett, K.P., Brice, M., Marwick, J.A., Taylor, R.S., Efremova, M., Vento-Tormo, R., Carragher, N.O., Kendall, T.J., Fallowfield, J.A., Harrison, E.M., Mole, D.J., Wigmore, S.J., Newsome, P.N., Weston, C.J., Iredale, J.P., Tacke, F., Pollard, J.W., Ponting, C.P., Marioni, J.C., Teichmann, S.A., Henderson, N.C., 2019. Resolving the fibrotic niche of human liver cirrhosis at single-cell level. *Nature* 575, 512–518. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1631-3>
- Raselli, T., Hearn, T., Wyss, A., Atrott, K., Peter, A., Frey-Wagner, I., Spalinger, M.R., Maggio, E.M., Sailer, A.W., Schmitt, J., Schreiner, P., Moncsek, A., Mertens, J., Scharl, M., Griffiths, W.J., Bueter, M., Geier, A., Rogler, G., Wang, Y., Misselwitz, B., 2019. Elevated oxysterol levels in human and mouse livers reflect nonalcoholic steatohepatitis. *J. Lipid Res.* 60, 1270–1283. <https://doi.org/10.1194/jlr.M093229>
- Ratziu, V., Harrison, S.A., Francque, S., Bedossa, P., Lehert, P., Serfaty, L., Romero-Gomez, M., Boursier, J., Abdelmalek, M., Caldwell, S., Drenth, J., Anstee, Q.M., Hum, D., Hanf, R., Roudot, A., Megnien, S., Staels, B., Sanyal, A., Mathurin, P., Gournay, J., Nguyen-Khac, E., De Ledinghen, V., Larrey, D., Tran, A., Bourliere, M., Maynard-Muet, M., Asselah, T., Henrion, J., Nevens, F., Cassiman, D., Geerts, A., Moreno, C., Beuers, U.H., Galle, P.R., Spengler, U., Bugianesi, E., Craxi, A., Angelico, M., Fargion,

- S., Voiculescu, M., Gheorghe, L., Preotescu, L., Caballeria, J., Andrade, R.J., Crespo, J., Callera, J.L., Ala, A., Aithal, G., Abouda, G., Luketic, V., Huang, M.A., Gordon, S., Pockros, P., Poordad, F., Shores, N., Moehlen, M.W., Bambha, K., Clark, V., Satapathy, S., Parekh, S., Reddy, R.K., Sheikh, M.Y., Szabo, G., Vierling, J., Foster, T., Umpierrez, G., Chang, C., Box, T., Gallegos-Orozco, J., 2016. 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. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2016.01.038>
- Rau, M., Schilling, A.-K., Meertens, J., Hering, I., Weiss, J., Jurowich, C., Kudlich, T., Hermanns, H.M., Bantel, H., Beyersdorf, N., Geier, A., 2016. 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. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1501175>
- Reboldi, A., Dang, E.V., McDonald, J.G., Liang, G., Russell, D.W., Cyster, J.G., 2014. 25-Hydroxycholesterol suppresses interleukin-1-driven inflammation downstream of type I interferon. *Science* 345, 679-684. <https://doi.org/10.1126/science.1254790>
- Rector, R.S., Thyfault, J.P., Uptergrove, G.M., Morris, E.M., Naples, S.P., Borengasser, S.J., Mikus, C.R., Laye, M.J., Laughlin, M.H., Booth, F.W., Ibdah, J.A., 2010. Mitochondrial dysfunction precedes insulin resistance and hepatic steatosis and contributes to the natural history of non-alcoholic fatty liver disease in an obese rodent model. *J. Hepatol.* 52, 727-736. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2009.11.030>
- Remmerie, A., Martens, L., Thoné, T., Castoldi, A., Seurinck, R., Pavie, B., Roels, J., Vanneste, B., De Prijck, S., Vanhockerhout, M., Binte Abdul Latib, M., Devisscher, L., Hoorens, A., Bonnardel, J., Vandamme, N., Kremer, A., Borghgraef, P., Van Vlierberghe, H., Lippens, S., Pearce, E., Saeys, Y., Scott, C.L., 2020. Osteopontin Expression Identifies a Subset of Recruited Macrophages Distinct from Kupffer Cells in the Fatty Liver. *Immunity* 53, 641-657.e14. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.08.004>
- Ren, Y., Zhao, H., Yin, C., Lan, X., Wu, L., Du, X., Griffiths, H.R., Gao, D., 2022. Adipokines, Hepatokines and Myokines: Focus on Their Role and Molecular Mechanisms in Adipose Tissue Inflammation. *Front. Endocrinol.* 13, 873699. <https://doi.org/10.3389/fendo.2022.873699>
- Repa, J.J., Liang, G., Ou, J., Bashmakov, Y., Lobaccaro, J.-M.A., Shimomura, I., Shan, B., Brown, M.S., Goldstein, J.L., Mangelsdorf, D.J., 2000. Regulation of mouse sterol regulatory element-binding protein-1c gene (SREBP-1c) by oxysterol receptors, LXRA and LXRb. *Genes Dev.* 14, 2819-2830.
- Ricchi, M., Odoardi, M.R., Carulli, L., Anzivino, C., Ballestri, S., Pinetti, A., Fantoni, L.I., Marra, F., Bertolotti, M., Banni, S., Lonardo, A., Carulli, N., Loria, P., 2009. Differential effect of oleic and palmitic acid on lipid accumulation and apoptosis in cultured hepatocytes. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 24, 830-840. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1746.2008.05733.x>
- Rogers, A.B., Dintzis, R.Z., 2018. Hepatobiliary System, in: *Comparative Anatomy and Histology*. Elsevier, pp. 229-239. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802900-8.00013-0>
- Rong, S., Cortés, V.A., Rashid, S., Anderson, N.N., McDonald, J.G., Liang, G., Moon, Y.-A., Hammer, R.E., Horton, J.D., 2017. Expression of SREBP-1c Requires SREBP-2-mediated Generation of a Sterol Ligand for LXR in Livers of Mice. *eLife* 6, e25015. <https://doi.org/10.7554/eLife.25015>
- Rong, X., Albert, C.J., Hong, C., Duerr, M.A., Chamberlain, B.T., Tarling, E.J., Ito, A., Gao, J., Wang, B., Edwards, P.A., Jung, M.E., Ford, D.A., Tontonoz, P., 2013. LXRs Regulate ER Stress and Inflammation through Dynamic Modulation of Membrane

- Phospholipid Composition. *Cell Metab.* 18, 685–697. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.10.002>
- Sabio, G., Das, M., Mora, A., Zhang, Z., Jun, J.Y., Ko, H.J., Barrett, T., Kim, J.K., Davis, R.J., 2008. A Stress Signaling Pathway in Adipose Tissue Regulates Hepatic Insulin Resistance. *Science* 322, 1539–1543. <https://doi.org/10.1126/science.1160794>
- Saito, T., Okumura, A., Watanabe, H., Asano, M., Ishida-Okawara, A., Sakagami, J., Sudo, K., Hatano-Yokoe, Y., Bezbradica, J.S., Joyce, S., Abo, T., Iwakura, Y., Suzuki, K., Yamagoe, S., 2004. Increase in Hepatic NKT Cells in Leukocyte Cell-Derived Chemotaxin 2-Deficient Mice Contributes to Severe Concanavalin A-Induced Hepatitis. *J. Immunol.* 173, 579–585. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.173.1.579>
- Sak, J.J., Prystupa, A., Kiciński, P., Luchowska-Kocot, D., Kurys-Denis, E., Bis-Wencel, H., 2021. Leukocyte cell-derived chemotaxin-2 and fibroblast growth factor 21 in alcohol-induced liver cirrhosis. *World J. Hepatol.* 13.
- Sakai, M., Troutman, T.D., Seidman, J.S., Ouyang, Z., Spann, N.J., Abe, Y., Ego, K.M., Bruni, C.M., Deng, Z., Schlachetzki, J.C.M., Nott, A., Bennett, H., Chang, J., Vu, B.T., Pasillas, M.P., Link, V.M., Texari, L., Heinz, S., Thompson, B.M., McDonald, J.G., Geissmann, F., Glass, C.K., 2019. Liver-Derived Signals Sequentially Reprogram Myeloid Enhancers to Initiate and Maintain Kupffer Cell Identity. *Immunity* 51, 655-670.e8. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.09.002>
- Sakiyama, H., Wynn, R.M., Lee, W.-R., Fukasawa, M., Mizuguchi, H., Gardner, K.H., Repa, J.J., Uyeda, K., 2008. Regulation of Nuclear Import/Export of Carbohydrate Response Element-binding Protein (ChREBP). *J. Biol. Chem.* 283, 24899–24908. <https://doi.org/10.1074/jbc.M804308200>
- Sallam, T., Jones, M., Thomas, B.J., Wu, X., Gilliland, T., Qian, K., Eskin, A., Casero, D., Zhang, Z., Sandhu, J., Salisbury, D., Rajbhandari, P., Civelek, M., Hong, C., Ito, A., Liu, X., Daniel, B., Lusic, A.J., Whitelegge, J., Nagy, L., Castrillo, A., Smale, S., Tontonoz, P., 2018. Transcriptional regulation of macrophage cholesterol efflux and atherogenesis by a long noncoding RNA. *Nat. Med.* 24, 304–312. <https://doi.org/10.1038/nm.4479>
- Sallam, T., Jones, M.C., Gilliland, T., Zhang, L., Wu, X., Eskin, A., Sandhu, J., Casero, D., Vallim, T.Q.D.A., Hong, C., Katz, M., Lee, R., Whitelegge, J., Tontonoz, P., 2016. Feedback modulation of cholesterol metabolism by the lipid-responsive non-coding RNA LeXis. *Nature* 534, 124–128. <https://doi.org/10.1038/nature17674>
- Samuel, V.T., Liu, Z.-X., Wang, A., Beddow, S.A., Geisler, J.G., Kahn, M., Zhang, X., Monia, B.P., Bhanot, S., Shulman, G.I., 2007. Inhibition of protein kinase C ϵ prevents hepatic insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease. *J. Clin. Invest.* 117, 739–745. <https://doi.org/10.1172/JCI30400>
- Sancho, D., Reis E Sousa, C., 2012. Signaling by Myeloid C-Type Lectin Receptors in Immunity and Homeostasis. *Annu. Rev. Immunol.* 30, 491–529. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-031210-101352>
- Sanyal, A., Charles, E.D., Neuschwander-Tetri, B.A., Loomba, R., Harrison, S.A., Abdelmalek, M.F., Lawitz, E.J., Halegoua-DeMarzio, D., Kundu, S., Noviello, S., Luo, Y., Christian, R., 2018. 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. *The Lancet* 392, 2705–2717. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31785-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31785-9)
- Sato, R., Goldstein, J.L., Brown, M.S., 1993. Replacement of serine-871 of hamster 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase prevents phosphorylation by AMP-activated kinase and blocks inhibition of sterol synthesis induced by ATP depletion. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90, 9261–9265. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.20.9261>

- Sato, S., Jung, H., Nakagawa, T., Pawlosky, R., Takeshima, T., Lee, W.-R., Sakiyama, H., Laxman, S., Wynn, R.M., Tu, B.P., MacMillan, J.B., De Brabander, J.K., Veech, R.L., Uyeda, K., 2016. Metabolite Regulation of Nuclear Localization of Carbohydrate-response Element-binding Protein (ChREBP). *J. Biol. Chem.* 291, 10515–10527. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.708982>
- Savage, D.B., 2006. Reversal of diet-induced hepatic steatosis and hepatic insulin resistance by antisense oligonucleotide inhibitors of acetyl-CoA carboxylases 1 and 2. *J. Clin. Invest.* 116, 817–824. <https://doi.org/10.1172/JCI27300>
- Savard, C., Tartaglione, E.V., Kuver, R., Haigh, W.G., Farrell, G.C., Subramanian, S., Chait, A., Yeh, M.M., Quinn, L.S., Ioannou, G.N., 2013. Synergistic interaction of dietary cholesterol and dietary fat in inducing experimental steatohepatitis. *Hepatology* 57, 81–92. <https://doi.org/10.1002/hep.25789>
- Scarpulla, R.C., 2012. Nucleus-encoded regulators of mitochondrial function: Integration of respiratory chain expression, nutrient sensing and metabolic stress. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gene Regul. Mech.* 1819, 1088–1097. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2011.10.011>
- Schaap, F.G., Trauner, M., Jansen, P.L.M., 2014. Bile acid receptors as targets for drug development. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 11, 55–67. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2013.151>
- Schultz, J.R., Tu, H., Luk, A., Repa, J.J., Medina, J.C., Li, L., Schwendner, S., Wang, S., Thoolen, M., Mangelsdorf, D.J., Lustig, K.D., Shan, B., 2000. Role of LXRs in control of lipogenesis. *Genes Dev.* 14, 2831–2838. <https://doi.org/10.1101/gad.850400>
- Schuster, S., Cabrera, D., Arrese, M., Feldstein, A.E., 2018. Triggering and resolution of inflammation in NASH. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 15, 349–364. <https://doi.org/10.1038/s41575-018-0009-6>
- Schwabe, R.F., Tabas, I., Pajvani, U.B., 2020. Mechanisms of Fibrosis Development in Nonalcoholic Steatohepatitis. *Gastroenterology* 158, 1913–1928. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2019.11.311>
- Scott, C.L., T'Jonck, W., Martens, L., Todorov, H., Sichien, D., Soen, B., Bonnardel, J., De Prijck, S., Vandamme, N., Cannoodt, R., Saelens, W., Vanneste, B., Toussaint, W., De Bleser, P., Takahashi, N., Vandenabeele, P., Henri, S., Pridans, C., Hume, D.A., Lambrecht, B.N., De Baetselier, P., Milling, S.W.F., Van Ginderachter, J.A., Malissen, B., Berx, G., Beschin, A., Saeys, Y., Guilliams, M., 2018. The Transcription Factor ZEB2 Is Required to Maintain the Tissue-Specific Identities of Macrophages. *Immunity* 49, 312–325.e5. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.07.004>
- Scott, C.L., Zheng, F., De Baetselier, P., Martens, L., Saeys, Y., De Prijck, S., Lippens, S., Abels, C., Schoonooghe, S., Raes, G., Devoogdt, N., Lambrecht, B.N., Beschin, A., Guilliams, M., 2016. Bone marrow-derived monocytes give rise to self-renewing and fully differentiated Kupffer cells. *Nat. Commun.* 7, 10321. <https://doi.org/10.1038/ncomms10321>
- Seidman, J.S., Troutman, T.D., Sakai, M., Gola, A., Spann, N.J., Bennett, H., Bruni, C.M., Ouyang, Z., Li, R.Z., Sun, X., Vu, B.T., Pasillas, M.P., Ego, K.M., Gosselin, D., Link, V.M., Chong, L.-W., Evans, R.M., Thompson, B.M., McDonald, J.G., Hosseini, M., Witztum, J.L., Germain, R.N., Glass, C.K., 2020. Niche-Specific Reprogramming of Epigenetic Landscapes Drives Myeloid Cell Diversity in Nonalcoholic Steatohepatitis. *Immunity* 52, 1057–1074.e7. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.04.001>
- Seki, E., De Minicis, S., Österreicher, C.H., Kluwe, J., Osawa, Y., Brenner, D.A., Schwabe, R.F., 2007. TLR4 enhances TGF- β signaling and hepatic fibrosis. *Nat. Med.* 13, 1324–1332. <https://doi.org/10.1038/nm1663>

- Sekiya, M., Yamamuro, D., Ohshiro, T., Honda, A., Takahashi, M., Kumagai, M., Sakai, K., Nagashima, S., Tomoda, H., Igarashi, M., Okazaki, H., Yagyu, H., Osuga, J., Ishibashi, S., 2014. Absence of Nceh1 augments 25-hydroxycholesterol-induced ER stress and apoptosis in macrophages. *J. Lipid Res.* 55, 2082–2092. <https://doi.org/10.1194/jlr.M050864>
- Serviddio, G., Bellanti, F., Tamborra, R., Rollo, T., Capitanio, N., Romano, A.D., Sastre, J., Vendemiale, G., Altomare, E., 2008. Uncoupling protein-2 (UCP2) induces mitochondrial proton leak and increases susceptibility of non-alcoholic steatohepatitis (NASH) liver to ischaemia-reperfusion injury. *Gut* 57, 957–965. <https://doi.org/10.1136/gut.2007.147496>
- Serviddio, G., Giudetti, A.M., Bellanti, F., Priore, P., Rollo, T., Tamborra, R., Siculella, L., Vendemiale, G., Altomare, E., Gnani, G.V., 2011. Oxidation of Hepatic Carnitine Palmitoyl Transferase-I (CPT-I) Impairs Fatty Acid Beta-Oxidation in Rats Fed a Methionine-Choline Deficient Diet. *PLoS ONE* 6, e24084. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024084>
- Shen, H.X., Li, L., Chen, Q., He, Y.Q., Yu, C.H., Chu, C.Q., Lu, X.J., Chen, J., 2016. LECT2 association with macrophage-mediated killing of *Helicobacter pylori* by activating NF- κ B and nitric oxide production. *Genet. Mol. Res.* 15. <https://doi.org/10.4238/gmr15048889>
- Shen, J., Sakaida, I., Uchida, K., Terai, S., Okita, K., 2005. Leptin enhances TNF- α production via p38 and JNK MAPK in LPS-stimulated Kupffer cells. *Life Sci.* 77, 1502–1515. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2005.04.004>
- Shimomura, I., Bashmakov, Y., Ikemoto, S., Horton, J.D., Brown, M.S., Goldstein, J.L., 1999. Insulin selectively increases SREBP-1c mRNA in the livers of rats with streptozotocin-induced diabetes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96, 13656–13661. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.24.13656>
- Shimomura, I., Shimano, H., Horton, J.D., Goldstein, J.L., Brown, M.S., 1997. Differential expression of exons 1a and 1c in mRNAs for sterol regulatory element binding protein-1 in human and mouse organs and cultured cells. *J. Clin. Invest.* 99, 838–845. <https://doi.org/10.1172/JCI119247>
- Singh, S., Allen, A.M., Wang, Z., Prokop, L.J., Murad, M.H., Loomba, R., 2015. Fibrosis Progression in Nonalcoholic Fatty Liver vs Nonalcoholic Steatohepatitis: A Systematic Review and Meta-analysis of Paired-Biopsy Studies. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 13, 643–654.e9. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2014.04.014>
- So, J.-S., Hur, K.Y., Tarrio, M., Ruda, V., Frank-Kamenetsky, M., Fitzgerald, K., Koteliansky, V., Lichtman, A.H., Iwawaki, T., Glimcher, L.H., Lee, A.-H., 2012. Silencing of Lipid Metabolism Genes through IRE1 α -Mediated mRNA Decay Lowers Plasma Lipids in Mice. *Cell Metab.* 16, 487–499. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.09.004>
- Solon-Biet, S.M., Cogger, V.C., Pulpitel, T., Heblinski, M., Wahl, D., McMahon, A.C., Warren, A., Durrant-Whyte, J., Walters, K.A., Krycer, J.R., Ponton, F., Gokarn, R., Wali, J.A., Ruohonen, K., Conigrave, A.D., James, D.E., Raubenheimer, D., Morrison, C.D., Le Couteur, D.G., Simpson, S.J., 2016. Defining the Nutritional and Metabolic Context of FGF21 Using the Geometric Framework. *Cell Metab.* 24, 555–565. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.09.001>
- Song, B.-L., Javitt, N.B., DeBose-Boyd, R.A., 2005. Insig-mediated degradation of HMG CoA reductase stimulated by lanosterol, an intermediate in the synthesis of cholesterol. *Cell Metab.* 1, 179–189. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2005.01.001>
- Srinivas, P.R., Wagner, A.S., Reddy, L.V., Deutsch, D.D., Leon, M.A., Goustin, A.S., Grunberger, G., 1993. Serum alpha 2-HS-glycoprotein is an inhibitor of the human insulin receptor at the tyrosine kinase level. *Mol. Endocrinol.* 7, 1445–1455. <https://doi.org/doi:10.1210/mend.7.11.7906861>

- Stättermayer, A.F., Halilbasic, E., Wrba, F., Ferenci, P., Trauner, M., 2020. Variants in ABCB4 (MDR3) across the spectrum of cholestatic liver diseases in adults. *J. Hepatol.* 73, 651–663. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2020.04.036>
- Stefan, N., Fritsche, A., Weikert, C., Boeing, H., Joost, H.-G., Häring, H.-U., Schulze, M.B., 2008. Plasma Fetuin-A Levels and the Risk of Type 2 Diabetes. *Diabetes* 57, 2762–2767. <https://doi.org/10.2337/db08-0538>
- Stefan, N., Häring, H.-U., 2013. Circulating fetuin-A and free fatty acids interact to predict insulin resistance in humans. *Nat. Med.* 19, 394–395. <https://doi.org/10.1038/nm.3116>
- Stefan, N., Hennige, A.M., Staiger, H., Machann, J.R., Schick, F., Machicao, F., Fritsche, A., Ring, H.-U.H., 2006. Fetuin-A Is Associated With Insulin Resistance and Fat Accumulation in the Liver in Humans. *DIABETES CARE* 29.
- Stiglund, N., Strand, K., Cornillet, M., Stål, P., Thorell, A., Zimmer, C.L., Näslund, E., Karlgren, S., Nilsson, H., Mellgren, G., Fernø, J., Hagström, H., Björkström, N.K., 2019. Retained NK Cell Phenotype and Functionality in Non-alcoholic Fatty Liver Disease. *Front. Immunol.* 10, 1255. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01255>
- Stine, J.G., Wentworth, B.J., Zimmet, A., Rinella, M.E., Loomba, R., Caldwell, S.H., Argo, C.K., 2018. Systematic review with meta-analysis: risk of hepatocellular carcinoma in non-alcoholic steatohepatitis without cirrhosis compared to other liver diseases. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 48, 696–703. <https://doi.org/10.1111/apt.14937>
- Stoeckman, A.K., Ma, L., Towle, H.C., 2004. Mlx Is the Functional Heteromeric Partner of the Carbohydrate Response Element-binding Protein in Glucose Regulation of Lipogenic Enzyme Genes. *J. Biol. Chem.* 279, 15662–15669. <https://doi.org/10.1074/jbc.M311301200>
- Su, T., Iwakiri, Y., 2020. Endothelial Leukocyte Cell-Derived Chemotaxin 2/Tyrosine Kinase With Immunoglobulin-Like and Epidermal Growth Factor-Like Domains 1 Signaling in Liver Fibrosis. *Hepatology* 72, 347–349. <https://doi.org/10.1002/hep.31183>
- Summers, S.A., Chaurasia, B., Holland, W.L., 2019. Metabolic Messengers: ceramides. *Nat. Metab.* 1, 1051–1058. <https://doi.org/10.1038/s42255-019-0134-8>
- Sun, S.-C., 2017. The non-canonical NF- κ B pathway in immunity and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* 17, 545–558. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.52>
- Sundqvist, A., Bengoechea-Alonso, M.T., Ye, X., Lukiyanchuk, V., Jin, J., Harper, J.W., Ericsson, J., 2005. Control of lipid metabolism by phosphorylation-dependent degradation of the SREBP family of transcription factors by SCFFbw7. *Cell Metab.* 1, 379–391. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2005.04.010>
- Sutti, S., Albano, E., 2020. Adaptive immunity: an emerging player in the progression of NAFLD. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 17, 81–92. <https://doi.org/10.1038/s41575-019-0210-2>
- Syed-Abdul, M.M., Parks, E.J., Gaballah, A.H., Bingham, K., Hammoud, G.M., Kemble, G., Buckley, D., McCulloch, W., Manrique-Acevedo, C., 2020. Fatty Acid Synthase Inhibitor TVB-2640 Reduces Hepatic de Novo Lipogenesis in Males With Metabolic Abnormalities. *Hepatology* 72, 103–118. <https://doi.org/10.1002/hep.31000>
- Syn, W.-K., Agboola, K.M., Swiderska, M., Michelotti, G.A., Liaskou, E., Pang, H., Xie, G., Philips, G., Chan, I.S., Karaca, G.F., Pereira, T.D.A., Chen, Y., Mi, Z., Kuo, P.C., Choi, S.S., Guy, C.D., Abdelmalek, M.F., Diehl, A.M., 2012. NKT-associated hedgehog and osteopontin drive fibrogenesis in non-alcoholic fatty liver disease. *Gut* 61, 1323–1329. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2011-301857>
- Syn, W.-K., Htun Oo, Y., Pereira, T.A., Karaca, G.F., Jung, Y., Omenetti, A., Witek, R.P., Choi, S.S., Guy, C.D., Fearing, C.M., Teaberry, V., Pereira, F.E.L., Adams, D.H., Diehl, A.M., 2010. Accumulation of natural killer T cells in progressive nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 51, 1998–2007. <https://doi.org/10.1002/hep.23599>

- Takahashi, Y., 2014. Histopathology of nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis. *World J. Gastroenterol.* 20, 15539. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i42.15539>
- Takata, H., Ikeda, Y., Suehiro, T., Ishibashi, A., Inoue, M., Kumon, Y., Terada, Y., 2009. High Glucose Induces Transactivation of the α 2-HS Glycoprotein Gene Through the ERK1/2 Signaling Pathway. *J. Atheroscler. Thromb.* 16, 448–459.
- Tall, A.R., Yvan-Charvet, L., 2015. Cholesterol, inflammation and innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 15, 104–116. <https://doi.org/10.1038/nri3793>
- Talukdar, S., Hillgartner, F.B., 2006. The mechanism mediating the activation of acetyl-coenzyme A carboxylase- α gene transcription by the liver X receptor agonist T0-901317. *J. Lipid Res.* 47, 2451–2461. <https://doi.org/10.1194/jlr.M600276-JLR200>
- Tandra, S., Yeh, M.M., Brunt, E.M., Vuppalanchi, R., Cummings, O.W., Ünalp-Arida, A., Wilson, L.A., Chalasani, N., 2011. Presence and significance of microvesicular steatosis in nonalcoholic fatty liver disease. *J. Hepatol.* 55, 654–659. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2010.11.021>
- Tang, T., Sui, Y., Lian, M., Li, Z., Hua, J., 2013. Pro-Inflammatory Activated Kupffer Cells by Lipids Induce Hepatic NKT Cells Deficiency through Activation-Induced Cell Death. *PLoS ONE* 8, e81949. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0081949>
- Tanisawa, K., Taniguchi, H., Sun, X., Ito, T., Kawakami, R., Sakamoto, S., Higuchi, M., 2017. Visceral fat area is a strong predictor of leukocyte cell-derived chemotaxin 2, a potential biomarker of dyslipidemia. *PLOS ONE* 12, e0173310. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0173310>
- Theurich, S., Tsaousidou, E., Hanssen, R., Lempradl, A.M., Mauer, J., Timper, K., Schilbach, K., Folz-Donahue, K., Heiling, C., Sendl, V., Pospisilik, J.A., Wunderlich, F.T., Brüning, J.C., 2017. IL-6/Stat3-Dependent Induction of a Distinct, Obesity-Associated NK Cell Subpopulation Deteriorates Energy and Glucose Homeostasis. *Cell Metab.* 26, 171–184.e6. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.05.018>
- Thoolen, B., Maronpot, R.R., Harada, T., Nyska, A., Rousseaux, C., Nolte, T., Malarkey, D.E., Kaufmann, W., Küttler, K., Deschl, U., Nakae, D., Gregson, R., Vinlove, M.P., Brix, A.E., Singh, B., Belpoggi, F., Ward, J.M., 2010. Proliferative and Nonproliferative Lesions of the Rat and Mouse Hepatobiliary System. *Toxicol. Pathol.* 38, 5S–81S. <https://doi.org/10.1177/0192623310386499>
- Tian, J., Goldstein, J.L., Brown, M.S., 2016. Insulin induction of SREBP-1c in rodent liver requires LXR α -C/EBP β complex. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 113, 8182–8187. <https://doi.org/10.1073/pnas.1608987113>
- Titchenell, P.M., Lazar, M.A., Birnbaum, M.J., 2017. Unraveling the Regulation of Hepatic Metabolism by Insulin. *Trends Endocrinol. Metab.* 28, 497–505. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2017.03.003>
- Tran, S., Baba, I., Poupel, L., Dussaud, S., Moreau, M., Gélinau, A., Marcelin, G., Magréau-Davy, E., Ouhachi, M., Lesnik, P., Boissonnas, A., Le Goff, W., Clausen, B.E., Yvan-Charvet, L., Sennlaub, F., Huby, T., Gautier, E.L., 2020. Impaired Kupffer Cell Self-Renewal Alters the Liver Response to Lipid Overload during Non-alcoholic Steatohepatitis. *Immunity* 53, 627–640.e5. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.06.003>
- Tricò, D., Mengozzi, A., Nesti, L., Hatunic, M., Gabriel Sanchez, R., Konrad, T., Lalić, K., Lalić, N.M., Mari, A., Natali, A., 2020. Circulating palmitoleic acid is an independent determinant of insulin sensitivity, beta cell function and glucose tolerance in non-diabetic individuals: a longitudinal analysis. *Diabetologia* 63, 206–218. <https://doi.org/10.1007/s00125-019-05013-6>

- Tschopp, J., Schroder, K., 2010. NLRP3 inflammasome activation: the convergence of multiple signalling pathways on ROS production? *Nat. Rev. Immunol.* 10, 210–215. <https://doi.org/10.1038/nri2725>
- Tummala, K.S., Gomes, A.L., Yilmaz, M., Graña, O., Bakiri, L., Ruppen, I., Ximénez-Embún, P., Sheshappanavar, V., Rodriguez-Justo, M., Pisano, D.G., Wagner, E.F., Djouder, N., 2014. Inhibition of De Novo NAD + Synthesis by Oncogenic URI Causes Liver Tumorigenesis through DNA Damage. *Cancer Cell* 26, 826–839. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2014.10.002>
- Turnbaugh, P.J., Ley, R.E., Mahowald, M.A., Magrini, V., Mardis, E.R., Gordon, J.I., 2006. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature* 444, 1027–1031. <https://doi.org/10.1038/nature05414>
- Uysal, K.T., Wiesbrock, S.M., Marino, M.W., 1997. Protection from obesity- induced insulin resistance in mice lacking TNF- α function 389.
- Van Der Veen, J.N., Lingrell, S., Da Silva, R.P., Jacobs, R.L., Vance, D.E., 2014. The Concentration of Phosphatidylethanolamine in Mitochondria Can Modulate ATP Production and Glucose Metabolism in Mice. *Diabetes* 63, 2620–2630. <https://doi.org/10.2337/db13-0993>
- Venteclef, N., Jakobsson, T., Ehrlund, A., Damdimopoulos, A., Mikkonen, L., Ellis, E., Nilsson, L.-M., Parini, P., Jänne, O.A., Gustafsson, J.-Å., Steffensen, K.R., Treuter, E., 2010. GPS2-dependent corepressor/SUMO pathways govern anti-inflammatory actions of LRH-1 and LXR β in the hepatic acute phase response. *Genes Dev.* 24, 381–395. <https://doi.org/10.1101/gad.545110>
- Viel, S., Besson, L., Charrier, E., Marçais, A., Disse, E., Bienvenu, J., Walzer, T., Dumontet, C., 2017. Alteration of Natural Killer cell phenotype and function in obese individuals. *Clin. Immunol.* 177, 12–17. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2016.01.007>
- Vijay-Kumar, M., Aitken, J.D., Carvalho, F.A., Cullender, T.C., Mwangi, S., Srinivasan, S., Sitaraman, S.V., Knight, R., Ley, R.E., Gewirtz, A.T., 2010. Metabolic Syndrome and Altered Gut Microbiota in Mice Lacking Toll-Like Receptor 5. *Science* 328, 228–231. <https://doi.org/10.1126/science.1179721>
- Vilar-Gomez, E., Martinez-Perez, Y., Calzadilla-Bertot, L., Torres-Gonzalez, A., Gra-Oramas, B., Gonzalez-Fabian, L., Friedman, S.L., Diago, M., Romero-Gomez, M., 2015. Weight Loss Through Lifestyle Modification Significantly Reduces Features of Nonalcoholic Steatohepatitis. *Gastroenterology* 149, 367–378.e5. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2015.04.005>
- Vollmar, B., Menger, M.D., 2009. The Hepatic Microcirculation: Mechanistic Contributions and Therapeutic Targets in Liver Injury and Repair. *Physiol. Rev.* 89, 1269–1339. <https://doi.org/10.1152/physrev.00027.2008>
- Wahlström, A., Sayin, S.I., Marschall, H.-U., Bäckhed, F., 2016. Intestinal Crosstalk between Bile Acids and Microbiota and Its Impact on Host Metabolism. *Cell Metab.* 24, 41–50. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.05.005>
- Wakil, S.J., Abu-Elheiga, L.A., 2009. Fatty acid metabolism: target for metabolic syndrome. *J. Lipid Res.* 50, S138–S143. <https://doi.org/10.1194/jlr.R800079-JLR200>
- Wallace, M., Metallo, C.M., 2020. Tracing insights into de novo lipogenesis in liver and adipose tissues. *Semin. Cell Dev. Biol.* 108, 65–71. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2020.02.012>
- Wang, B., Tontonoz, P., 2018. Liver X receptors in lipid signalling and membrane homeostasis. *Nat. Rev. Endocrinol.* 14, 452–463. <https://doi.org/10.1038/s41574-018-0037-x>
- Wang, C., Zhao, Y., Gao, X., Li, L., Yuan, Y., Liu, F., Zhang, L., Wu, J., Hu, P., Zhang, X., Gu, Y., Xu, Y., Wang, Z., Li, Z., Zhang, H., Ye, J., 2015. Perilipin 5 improves hepatic

- lipotoxicity by inhibiting lipolysis. *Hepatology* 61, 870–882. <https://doi.org/10.1002/hep.27409>
- Wang, H., Mehal, W., Nagy, L.E., Rotman, Y., 2021. Immunological mechanisms and therapeutic targets of fatty liver diseases. *Cell. Mol. Immunol.* 18, 73–91. <https://doi.org/10.1038/s41423-020-00579-3>
- Wang, J., Chen, Y., Pan, R., Wu, C., Chen, S., Li, L., Li, Y., Yu, C., Meng, Z., Xu, C., 2021. Leukocyte cell-derived chemotaxin 2 promotes the development of nonalcoholic fatty liver disease through STAT-1 pathway in mice. *Liver Int.* 41, 777–787. <https://doi.org/10.1111/liv.14816>
- Wang, M., Kaufman, R.J., 2016. Protein misfolding in the endoplasmic reticulum as a conduit to human disease. *Nature* 529, 326–335. <https://doi.org/10.1038/nature17041>
- Wang, M., Wang, K., Liao, X., Hu, H., Chen, L., Meng, L., Gao, W., Li, Q., 2021. Carnitine Palmitoyltransferase System: A New Target for Anti-Inflammatory and Anticancer Therapy? *Front. Pharmacol.* 12, 760581. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.760581>
- Wang, S., Chen, Z., Lam, V., Han, J., Hassler, J., Finck, B.N., Davidson, N.O., Kaufman, R.J., 2012. IRE1 α -XBP1s Induces PDI Expression to Increase MTP Activity for Hepatic VLDL Assembly and Lipid Homeostasis. *Cell Metab.* 16, 473–486. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.09.003>
- Wang, X., Bove, A.M., Simone, G., Ma, B., 2020. Molecular Bases of VEGFR-2-Mediated Physiological Function and Pathological Role. *Front. Cell Dev. Biol.* 8, 599281. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.599281>
- Wang, X., Zheng, Z., Caviglia, J.M., Corey, K.E., Herfel, T.M., Cai, B., Masia, R., Chung, R.T., Lefkowitz, J.H., Schwabe, R.F., Tabas, I., 2016. Hepatocyte TAZ/WWTR1 Promotes Inflammation and Fibrosis in Nonalcoholic Steatohepatitis. *Cell Metab.* 24, 848–862. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.09.016>
- Watanabe, A., Hashmi, A., Gomes, D.A., Town, T., Badou, A., Flavell, R.A., Mehal, W.Z., 2007. Apoptotic hepatocyte DNA inhibits hepatic stellate cell chemotaxis via toll-like receptor 9. *Hepatology* 46, 1509–1518. <https://doi.org/10.1002/hep.21867>
- Watanabe, A., Sohail, M.A., Gomes, D.A., Hashmi, A., Nagata, J., Sutterwala, F.S., Mahmood, S., Jhandier, M.N., Shi, Y., Flavell, R.A., Mehal, W.Z., 2009. Inflammasome-mediated regulation of hepatic stellate cells. *Am. J. Physiol.-Gastrointest. Liver Physiol.* 296, G1248–G1257. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.90223.2008>
- Wei, Y., Wang, D., Topczewski, F., Pagliassotti, M.J., 2006. Saturated fatty acids induce endoplasmic reticulum stress and apoptosis independently of ceramide in liver cells. *Am. J. Physiol.-Endocrinol. Metab.* 291, E275–E281. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00644.2005>
- Widenmaier, S.B., Snyder, N.A., Nguyen, T.B., Arduini, A., Lee, G.Y., Arruda, A.P., Saksi, J., Bartelt, A., Hotamisligil, G.S., 2017. NRF1 Is an ER Membrane Sensor that Is Central to Cholesterol Homeostasis. *Cell* 171, 1094–1109.e15. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.10.003>
- Willis, S.A., Sargeant, J.A., Yates, T., Takamura, T., Takayama, H., Gupta, V., Brittain, E., Crawford, J., Parry, S.A., Thackray, A.E., Varela-Mato, V., Stensel, D.J., Woods, R.M., Hulston, C.J., Aithal, G.P., King, J.A., 2020. Acute Hyperenergetic, High-Fat Feeding Increases Circulating FGF21, LECT2, and Fetuin-A in Healthy Men. *J. Nutr.* 150, 1076–1085. <https://doi.org/10.1093/jn/nxz333>
- Willy, P.J., Umesono, K., Ong, E.S., Evans, R.M., Heyman, R.A., Mangelsdorf, D.J., 1995. LXR, a nuclear receptor that defines a distinct retinoid response pathway. *Genes Dev.* 9, 1033–1045. <https://doi.org/10.1101/gad.9.9.1033>
- Wolf, A.M., Wolf, D., Rumpold, H., Enrich, B., Tilg, H., 2004. Adiponectin induces the anti-inflammatory cytokines IL-10 and IL-1RA in human leukocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 323, 630–635. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.08.145>

- Wolf, M.J., Adili, A., Piotrowitz, K., Abdullah, Z., Boege, Y., Stemmer, K., Ringelhan, M., Simonavicius, N., Egger, M., Wohlleber, D., Lorentzen, A., Einer, C., Schulz, S., Clavel, T., Protzer, U., Thiele, C., Zischka, H., Moch, H., Tschöp, M., Tumanov, A.V., Haller, D., Unger, K., Karin, M., Kopf, M., Knolle, P., Weber, A., Heikenwalder, M., 2014. 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. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2014.09.003>
- Wouters, K., Van Bilsen, M., Van Gorp, P.J., Bieghs, V., Lütjohann, D., Kerksiek, A., Staels, B., Hofker, M.H., Shiri-Sverdlov, R., 2010. Intrahepatic cholesterol influences progression, inhibition and reversal of non-alcoholic steatohepatitis in hyperlipidemic mice. *FEBS Lett.* 584, 1001–1005. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.01.046>
- Wree, A., Eguchi, A., McGeough, M.D., Pena, C.A., Johnson, C.D., Canbay, A., Hoffman, H.M., Feldstein, A.E., 2014a. NLRP3 inflammasome activation results in hepatocyte pyroptosis, liver inflammation, and fibrosis in mice: *Hepatology*. *Hepatology* 59, 898–910. <https://doi.org/10.1002/hep.26592>
- Wree, A., McGeough, M.D., Peña, C.A., Schlattjan, M., Li, H., Inzaugarat, M.E., Messer, K., Canbay, A., Hoffman, H.M., Feldstein, A.E., 2014b. NLRP3 inflammasome activation is required for fibrosis development in NAFLD. *J. Mol. Med.* 92, 1069–1082. <https://doi.org/10.1007/s00109-014-1170-1>
- Wu, X., Williams, K.J., 2012. NOX4 Pathway as a Source of Selective Insulin Resistance and Responsiveness. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 32, 1236–1245. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.111.244525>
- Xie, G., Karaca, G., Swiderska-Syn, M., Michelotti, G.A., Krüger, L., Chen, Y., Premont, R.T., Choi, S.S., Diehl, A.M., 2013. Cross-talk between Notch and Hedgehog regulates hepatic stellate cell fate in mice. *Hepatology* 58, 1801–1813. <https://doi.org/10.1002/hep.26511>
- Xie, G., Wang, X., Wang, Lei, Wang, Lin, Atkinson, R.D., Kanel, G.C., Gaarde, W.A., DeLeve, L.D., 2012. Role of Differentiation of Liver Sinusoidal Endothelial Cells in Progression and Regression of Hepatic Fibrosis in Rats. *Gastroenterology* 142, 918–927.e6. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.12.017>
- Xie, Y., Zhong, K.-B., Hu, Y., Xi, Y.-L., Guan, S.-X., Xu, M., Lin, Y., Liu, F.-Y., Zhou, W.-J., Gao, Y., 2022. Liver infiltration of multiple immune cells during the process of acute liver injury and repair. *World J. Gastroenterol.* 28, 6537–6550. <https://doi.org/10.3748/wjg.v28.i46.6537>
- Xu, H., Li, X., Wu, Z., Zhao, L., Shen, J., Liu, J., Qin, J., Shen, Y., Ke, J., Wei, Y., Li, J., Gao, Y., 2021. LECT2, A Novel and Direct Biomarker of Liver Fibrosis in Patients With CHB. *Front. Mol. Biosci.* 8, 749648. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.749648>
- Xu, J., Lloyd, D.J., Hale, C., Stanislaus, S., Chen, M., Sivits, G., Vonderfecht, S., Hecht, R., Li, Y.-S., Lindberg, R.A., Chen, J.-L., Young Jung, D., Zhang, Z., Ko, H.-J., Kim, J.K., Véniant, M.M., 2009. Fibroblast Growth Factor 21 Reverses Hepatic Steatosis, Increases Energy Expenditure, and Improves Insulin Sensitivity in Diet-Induced Obese Mice. *Diabetes* 58, 250–259. <https://doi.org/10.2337/db08-0392>
- Xu, M., Xu, H.-H., Lin, Y., Sun, X., Wang, L.-J., Fang, Z.-P., Su, X.-H., Liang, X.-J., Hu, Y., Liu, Z.-M., Cheng, Y., Wei, Y., Li, J., Li, L., Liu, H.-J., Cheng, Z., Tang, N., Peng, C., Li, T., Liu, T., Qiao, L., Wu, D., Ding, Y.-Q., Zhou, W.-J., 2019. LECT2, a Ligand for Tie1, Plays a Crucial Role in Liver Fibrogenesis. *Cell* 178, 1478–1492.e20. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.07.021>
- Yabe, D., Brown, M.S., Goldstein, J.L., 2002. Insig-2, a second endoplasmic reticulum protein that binds SCAP and blocks export of sterol regulatory element-binding proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99, 12753–12758. <https://doi.org/10.1073/pnas.162488899>

- Yahoo, N., Dudek, M., Knolle, P., Heikenwalder, M., 2023. Role of immune responses in the development of NAFLD-associated liver cancer and prospects for therapeutic modulation. *J. Hepatol.* 79, 538–551. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2023.02.033>
- Yamagoe, S., Akasaka, T., Uchida, T., Hachiya, T., Okabe, T., Yamakawa, Y., Arai, T., Mizuno, S., Suzuki, K., 1997. Expression of a Neutrophil Chemotactic Protein LECT2 in Human Hepatocytes Revealed by Immunochemical Studies Using Polyclonal and Monoclonal Antibodies to a Recombinant LECT2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 237, 116–120. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1997.7095>
- Yamagoe, S., Kameoka, Y., Hashimoto, K., Mizuno, S., Suzuki, K., 1998a. Molecular Cloning, Structural Characterization, and Chromosomal Mapping of the Human LECT2 Gene. *Genomics* 48, 324–329. <https://doi.org/10.1006/geno.1997.5198>
- Yamagoe, S., Mizuno, S., Suzuki, K., 1998b. Molecular cloning of human and bovine LECT2 having a neutrophil chemotactic activity and its specific expression in the liver. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gene Struct. Expr.* 1396, 105–113. [https://doi.org/10.1016/S0167-4781\(97\)00181-4](https://doi.org/10.1016/S0167-4781(97)00181-4)
- Yamagoe, S., Watanabe, T., Mizuno, S., Suzuki, K., 1998c. The mouse Lect2 gene: cloning of cDNA and genomic DNA, structural characterization and chromosomal localization. *Gene* 216, 171–178. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(98\)00294-7](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(98)00294-7)
- Yamagoe, S., Yamakawa, Y., Matsuo, Y., Minowada, J., Mizuno, S., Suzuki, K., 1996. Purification and primary amino acid sequence of a novel neutrophil chemotactic factor LECT2. *Immunol. Lett.* 52, 9–13.
- Yamaguchi, K., Yang, L., McCall, S., Huang, J., Yu, X.X., Pandey, S.K., Bhanot, S., Monia, B.P., Li, Y.-X., Diehl, A.M., 2007. Inhibiting triglyceride synthesis improves hepatic steatosis but exacerbates liver damage and fibrosis in obese mice with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 45, 1366–1374. <https://doi.org/10.1002/hep.21655>
- Yamamoto, M., Kensler, T.W., Motohashi, H., 2018. The KEAP1-NRF2 System: a Thiol-Based Sensor-Effector Apparatus for Maintaining Redox Homeostasis. *Physiol. Rev.* 98, 1169–1203. <https://doi.org/10.1152/physrev.00023.2017>
- Yamamoto, T., Shimano, H., Inoue, N., Nakagawa, Y., Matsuzaka, T., Takahashi, A., Yahagi, N., Sone, H., Suzuki, H., Toyoshima, H., Yamada, N., 2007. Protein Kinase A Suppresses Sterol Regulatory Element-binding Protein-1C Expression via Phosphorylation of Liver X Receptor in the Liver. *J. Biol. Chem.* 282, 11687–11695. <https://doi.org/10.1074/jbc.M611911200>
- Yamashita, H., Takenoshita, M., Sakurai, M., Bruick, R.K., Henzel, W.J., Shillinglaw, W., Arnot, D., Uyeda, K., 2001. A glucose-responsive transcription factor that regulates carbohydrate metabolism in the liver. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98, 9116–9121. <https://doi.org/10.1073/pnas.161284298>
- Yang, C., McDonald, J.G., Patel, A., Zhang, Y., Umetani, M., Xu, F., Westover, E.J., Covey, D.F., Mangelsdorf, D.J., Cohen, J.C., Hobbs, H.H., 2006. Sterol Intermediates from Cholesterol Biosynthetic Pathway as Liver X Receptor Ligands. *J. Biol. Chem.* 281, 27816–27826. <https://doi.org/10.1074/jbc.M603781200>
- Yang, L., Jhaveri, R., Huang, J., Qi, Y., Diehl, A.M., 2007. Endoplasmic reticulum stress, hepatocyte CD1d and NKT cell abnormalities in murine fatty livers. *Lab. Invest.* 87, 927–937. <https://doi.org/10.1038/labinvest.3700603>
- Yecies, J.L., Zhang, H.H., Menon, S., Liu, S., Yecies, D., Lipovsky, A.I., Gorgun, C., Kwiatkowski, D.J., Hotamisligil, G.S., Lee, C.-H., Manning, B.D., 2011. Akt Stimulates Hepatic SREBP1c and Lipogenesis through Parallel mTORC1-Dependent and Independent Pathways. *Cell Metab.* 14, 21–32. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.06.002>
- Yellaturu, C.R., Deng, X., Cagen, L.M., Wilcox, H.G., Mansbach, C.M., Siddiqi, S.A., Park, E.A., Raghov, R., Elam, M.B., 2009. Insulin Enhances Post-translational Processing of

- Nascent SREBP-1c by Promoting Its Phosphorylation and Association with COPII Vesicles. *J. Biol. Chem.* 284, 7518–7532. <https://doi.org/10.1074/jbc.M805746200>
- Yoo, H.J., Hwang, S.Y., Choi, J.-H., Lee, H.J., Chung, H.S., Seo, J.-A., Kim, S.G., Kim, N.H., Baik, S.H., Choi, D.S., Choi, K.M., 2017. Association of leukocyte cell-derived chemotaxin 2 (LECT2) with NAFLD, metabolic syndrome, and atherosclerosis. *PLOS ONE* 12, e0174717. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174717>
- Yoshikawa, T., Ide, T., Shimano, H., Yahagi, N., Amemiya-Kudo, M., Matsuzaka, T., Yatoh, S., Kitamine, T., Okazaki, H., Tamura, Y., Sekiya, M., Takahashi, A., Hasty, A.H., Sato, R., Sone, H., Osuga, J., Ishibashi, S., Yamada, N., 2003. Cross-Talk between Peroxisome Proliferator-Activated Receptor (PPAR) α and Liver X Receptor (LXR) in Nutritional Regulation of Fatty Acid Metabolism. I. PPARs Suppress Sterol Regulatory Element Binding Protein-1c Promoter through Inhibition of LXR Signaling. *Mol. Endocrinol.* 17, 1240–1254. <https://doi.org/10.1210/me.2002-0190>
- Yoshikawa, T., Shimano, H., Amemiya-Kudo, M., Yahagi, N., Hasty, A.H., Matsuzaka, T., Okazaki, H., Tamura, Y., Iizuka, Y., Ohashi, K., Osuga, J.-I., Harada, K., Gotoda, T., Kimura, S., Ishibashi, S., Yamada, N., 2001. Identification of Liver X Receptor-Retinoid X Receptor as an Activator of the Sterol Regulatory Element-Binding Protein 1c Gene Promoter. *Mol. Cell. Biol.* 21, 2991–3000. <https://doi.org/10.1128/MCB.21.9.2991-3000.2001>
- Younossi, Z.M., Baranova, A., Ziegler, K., Del Giacco, L., Schlauch, K., Born, T.L., Elariny, H., Gorreta, F., VanMeter, A., Younoszai, A., Ong, J.P., Goodman, Z., Chandhoke, V., 2005. A genomic and proteomic study of the spectrum of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 42, 665–674. <https://doi.org/10.1002/hep.20838>
- Younossi, Z.M., Golabi, P., Paik, J.M., Henry, A., Van Dongen, C., Henry, L., 2023a. The global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) and nonalcoholic steatohepatitis (NASH): a systematic review. *Hepatology* 77, 1335–1347. <https://doi.org/10.1097/HEP.0000000000000004>
- Younossi, Z.M., Ratziu, V., Loomba, R., Rinella, M., Anstee, Q.M., Goodman, Z., Bedossa, P., Geier, A., Beckebaum, S., Newsome, P.N., Sheridan, D., Sheikh, M.Y., Trotter, J., Knapple, W., Lawitz, E., Abdelmalek, M.F., Kowdley, K.V., Montano-Loza, A.J., Boursier, J., Mathurin, P., Bugianesi, E., Mazzella, G., Olveira, A., Cortez-Pinto, H., Graupera, I., Orr, D., Gluud, L.L., Dufour, Jean-Francois, Shapiro, D., Campagna, J., Zaru, L., MacConell, L., Shringarpure, R., Harrison, S., Sanyal, A.J., Abdelmalek, M., Abrams, G., Aguilar, H., Ahmed, A., Aigner, E., Aithal, G., Ala, A., Alazawi, W., Albillos, A., Allison, M., Al-Shamma, S., Andrade, R., Andreone, P., Angelico, M., Ankoma-Sey, V., Anstee, Q., Anty, R., Araya, V., Arenas Ruiz, J.I., Arkkila, P., Arora, M., Asselah, T., Au, J., Ayonrinde, O., Bailey, R.J., Balakrishnan, M., Bambha, K., Bansal, M., Barritt, S., Bate, J., Beato, J., Beckebaum, S., Behari, J., Bellot, P., Ben Ari, Z., Bennett, M., Berenguer, M., Beretta-Piccoli, B.T., Berg, T., Bonacini, M., Bonet, L., Borg, B., Bourliere, M., Boursier, J., Bowman, W., Bradley, D., Brankovic, M., Braun, M., Bronowicki, J.-P., Bruno, S., Bugianesi, E., Cai, C., Calderon, A., Calleja Panero, J.L., Carey, E., Carmiel, M., Carrión, J.A., Cave, M., Chagas, C., Chami, T., Chang, A., Coates, A., Cobbold, J., Costentin, C., Corey, K., Corless, L., Cortez-Pinto, H., Crespo, J., Cruz Pereira, O., De Ledinghen, V., deLemos, A., Diago, M., Dong, M., Dufour, Jean-François, Dugalic, P., Dunn, W., Elkhatab, M., Epstein, M., Escudero-Garcia, M.D., Etzion, O., Evans, L., Falcone, R., Fernandez, C., Ferreira, J., Fink, S., Finnegan, K., Firpi-Morell, R., Floreani, A., Fontanges, T., Ford, R., Forrest, E., Fowell, A., Fracanzani, A.L., Francque, S., Freilich, B., Frias, J., Fuchs, M., Fuentes, J., Galambos, M., Gallegos, J., Geerts, A., Geier, A., George, J., Ghali, M., Ghalib, R., Gholam, P., Gines, P., Gitlin, N., Gluud, L.L., Goeser, T., Goff, J., Gordon, S., Gordon, F., Gorla, O., Greer, S., Grigorian, A., Gronbaek, H., Guillaume, M., Gunaratnam, N., Halegoua-De

- Marzio, D., Hameed, B., Hametner, S., Hamilton, J., Harrison, S., Hartleb, M., Hassanein, T., Häussinger, D., Hellstern, P., Herring, R., Heurich, E., Hezode, C., Hinrichsen, H., Holland Fischer, P., Horsmans, Y., Huang, J., Hussaini, H., Jakiche, A., Jeffers, L., Jones, B., Jorge, R., Jorquera, F., Joshi, S., Kahraman, A., Kaita, K., Karyotakis, N., Kayali, Z., Kechagias, S., Kepczyk, T., Khalili, M., Khallafi, H., Kluwe, J., Knapple, W., Kohli, A., Korenblat, K., Kowdley, K., Krag, A., Krause, R., Kremer, A., Krok, K., Krstic, M., Kugelmas, M., Kumar, S., Kuwada, S., Labarriere, D., Lai, M., Laleman, W., Lampertico, P., Lawitz, E., Lee, A., Leroy, V., Lidofsky, S., Lim, T.H., Lim, J., Lipkis, D., Little, E., Lonardo, A., Long, M., Loomba, R., Luketic, V.A.C., Lurie, Y., Macedo, G., Magalhaes, J., Makara, M., Maliakkal, B., Manns, M., Manousou, P., Mantry, P., Marchesini, G., Marinho, C., Marotta, P., Marschall, H.-U., Martinez, L., Mathurin, P., Mayo, M., Mazzella, G., McCullen, M., McLaughlin, W., Merle, U., Merriman, R., Modi, A., Molina, E., Montano-Loza, A., Monteverde, C., Morales Cardona, A., Moreea, S., Moreno, C., Morisco, F., Mubarak, A., Muellhaupt, B., Mukherjee, S., Müller, T., Nagorni, A., Naik, J., Neff, G., Nevah, M., Newsome, P., Nguyen-Khac, E., Nouredin, M., Oben, J., Olveira, A., Orlent, H., Orr, D., Orr, J., Ortiz-Lasanta, G., Ozenne, V., Pandya, P., Paredes, A., Park, J., Patel, J., Patel, K., Paul, S., Patton, H., Peck-Radosavljevic, M., Petta, S., Pianko, S., Piekarska, A., Pimstone, N., Pisegna, J., Pockros, P., Pol, S., Porayko, M., Poulos, J., Pound, D., Pouzar, J., Presa Ramos, J., Pysopoulos, N., Rafiq, N., Muller, K., Ramji, A., Ratziu, V., Ravinuthala, R., Reddy, C., Reddy K G, G., Reddy K R, K.R., Regenstein, F., Reindollar, R., Reynolds, J., Riera, A., Rinella, M., Rivera Acosta, J., Robaey, G., Roberts, S., Rodriguez-Perez, F., Romero, S., Romero-Gomez, M., Rubin, R., Rumi, M., Rushbrook, S., Rust, C., Ryan, M., Safadi, R., Said, A., Salminen, K., Samuel, D., Santoro, J., Sanyal, A., Sarkar, S., Schaeffer, C., Schattenberg, J., Schiefke, I., Schiff, E., Schmidt, W., Schneider, J., Schouten, J., Schultz, M., Sebastiani, G., Semela, D., Sepe, T., Sheikh, A., Sheikh, M., Sheridan, D., Sherman, K., Shibolet, O., Shiffman, M., Siddique, A., Sieberhagen, C., Sigal, S., Sikorska, K., Simon, K., Sinclair, M., Skoien, R., Solis, J., Sood, S., Souder, B., Spivey, J., Stal, P., Stinton, L., Strasser, S., Svorcan, P., Szabo, G., Talal, A., Tam, E., Tetri, B., Thuluvath, P., Tobias, H., Tomasiewicz, K., Torres, D., Tran, A., Trauner, M., Trautwein, C., Trotter, J., Tsochatzis, E., Unitt, E., Vargas, V., Varkonyi, I., Veitsman, E., Vespasiani Gentilucci, U., Victor, D., Vierling, J., Vincent, C., Vincze, A., Von Der Ohe, M., Von Roenn, N., Vuppalanchi, R., Waters, M., Watt, K., Wattacheril, J., Weltman, M., Wieland, A., Wiener, G., Williams A, A., Williams J, J., Wilson, J., Yataco, M., Yoshida, E., Younes, Z., Yuan, L., Zivony, A., Zogg, D., Zoller, H., Zoulim, F., Zuckerman, E., Zuin, M., 2019. Obeticholic acid for the treatment of non-alcoholic steatohepatitis: interim analysis from a multicentre, randomised, placebo-controlled phase 3 trial. *The Lancet* 394, 2184–2196. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)33041-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)33041-7)
- Younossi, Z.M., Stepanova, M., Ong, J., Trimble, G., AlQahtani, S., Younossi, I., Ahmed, A., Racila, A., Henry, L., 2021. Nonalcoholic Steatohepatitis Is the Most Rapidly Increasing Indication for Liver Transplantation in the United States. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 19, 580-589.e5. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2020.05.064>
- Younossi, Z.M., Wong, G., Anstee, Q.M., Henry, L., 2023b. The Global Burden of Liver Disease. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 21, 1978–1991. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2023.04.015>
- Yu, E.L., Schwimmer, J.B., 2021. Epidemiology of Pediatric Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Clin. Liver Dis.* 17, 196–199. <https://doi.org/10.1002/cld.1027>
- Yu, L., Bharadwaj, S., Brown, J.M., Ma, Y., Du, W., Davis, M.A., Michaely, P., Liu, P., Willingham, M.C., Rudel, L.L., 2006. Cholesterol-regulated Translocation of NPC1L1

- to the Cell Surface Facilitates Free Cholesterol Uptake. *J. Biol. Chem.* 281, 6616–6624. <https://doi.org/10.1074/jbc.M511123200>
- Yu, L., York, J., Von Bergmann, K., Lutjohann, D., Cohen, J.C., Hobbs, H.H., 2003. Stimulation of Cholesterol Excretion by the Liver X Receptor Agonist Requires ATP-binding Cassette Transporters G5 and G8. *J. Biol. Chem.* 278, 15565–15570. <https://doi.org/10.1074/jbc.M301311200>
- Yvan-Charvet, L., Welch, C., Pagler, T.A., Ranalletta, M., Lamkanfi, M., Han, S., Ishibashi, M., Li, R., Wang, N., Tall, A.R., 2008. Increased Inflammatory Gene Expression in ABC Transporter-Deficient Macrophages: Free Cholesterol Accumulation, Increased Signaling via Toll-Like Receptors, and Neutrophil Infiltration of Atherosclerotic Lesions. *Circulation* 118, 1837–1847. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.108.793869>
- Zadoorian, A., Du, X., Yang, H., 2023. Lipid droplet biogenesis and functions in health and disease. *Nat. Rev. Endocrinol.* 19, 443–459. <https://doi.org/10.1038/s41574-023-00845-0>
- Zechner, R., Zimmermann, R., Eichmann, T.O., Kohlwein, S.D., Haemmerle, G., Lass, A., Madeo, F., 2012. FAT SIGNALS - Lipases and Lipolysis in Lipid Metabolism and Signaling. *Cell Metab.* 15, 279–291. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.12.018>
- Zelcer, N., Hong, C., Boyadjian, R., Tontonoz, P., 2009. LXR Regulates Cholesterol Uptake Through Idol-Dependent Ubiquitination of the LDL Receptor. *Science* 325, 100–104. <https://doi.org/10.1126/science.1168974>
- Zenewicz, L.A., Yancopoulos, G.D., Valenzuela, D.M., Murphy, A.J., Karow, M., Flavell, R.A., 2007. Interleukin-22 but Not Interleukin-17 Provides Protection to Hepatocytes during Acute Liver Inflammation. *Immunity* 27, 647–659. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2007.07.023>
- Zhang, D., Tong, X., VanDommelen, K., Gupta, N., Stamper, K., Brady, G.F., Meng, Z., Lin, J., Rui, L., Omary, M.B., Yin, L., 2017. Lipogenic transcription factor ChREBP mediates fructose-induced metabolic adaptations to prevent hepatotoxicity. *J. Clin. Invest.* 127, 2855–2867. <https://doi.org/10.1172/JCI89934>
- Zhang, K., Wang, S., Malhotra, J., Hassler, J.R., Back, S.H., Wang, G., Chang, L., Xu, W., Miao, H., Leonardi, R., Chen, Y.E., Jackowski, S., Kaufman, R.J., 2011. The unfolded protein response transducer IRE1 α prevents ER stress-induced hepatic steatosis: IRE1 α prevents ER stress-induced hepatic steatosis. *EMBO J.* 30, 1357–1375. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.52>
- Zhang, L., Rajbhandari, P., Priest, C., Sandhu, J., Wu, X., Temel, R., Castrillo, A., De Aguiar Vallim, T.Q., Sallam, T., Tontonoz, P., 2017. Inhibition of cholesterol biosynthesis through RNF145-dependent ubiquitination of SCAP. *eLife* 6, e28766. <https://doi.org/10.7554/eLife.28766>
- Zhang, X., Sun, K., Tang, C., Cen, L., Li, S., Zhu, W., Liu, P., Chen, Y., Yu, C., Li, L., 2023. LECT2 modulates dendritic cell function after *Helicobacter pylori* infection via the CD209a receptor. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 38, 625–633. <https://doi.org/10.1111/jgh.16138>
- Zhao, D., Yang, F., Wang, Y., Li, S., Li, Y., Hou, F., Yang, W., Liu, D., Tao, Y., Li, Q., Wang, J., He, F., Tang, L., 2022. ALK1 signaling is required for the homeostasis of Kupffer cells and prevention of bacterial infection. *J. Clin. Invest.* 132, e150489. <https://doi.org/10.1172/JCI150489>
- Zhao, J., Xu, X., Gou, Q., Zheng, Q., Ge, L., Chen, L., Zhang, C., Ma, H., Lin, S., Hu, X., Zhan, J., 2022. TGF- β 1-Mediated Leukocyte Cell-Derived Chemotaxin 2 Is Associated With Liver Fibrosis in Biliary Atresia. *Front. Pediatr.* 10, 901888. <https://doi.org/10.3389/fped.2022.901888>

- Zhao, Y., Ye, W., Wang, Y.-D., Chen, W.-D., 2022. HGF/c-Met: A Key Promoter in Liver Regeneration. *Front. Pharmacol.* 13, 808855. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.808855>
- Zheng, H., Miyakawa, T., Sawano, Y., Asano, A., Okumura, A., Yamagoe, S., Tanokura, M., 2016. Crystal Structure of Human Leukocyte Cell-derived Chemotaxin 2 (LECT2) Reveals a Mechanistic Basis of Functional Evolution in a Mammalian Protein with an M23 Metalloendopeptidase Fold. *J. Biol. Chem.* 291, 17133–17142. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.720375>
- Zhou, F., Sun, X., 2021. Cholesterol Metabolism: A Double-Edged Sword in Hepatocellular Carcinoma. *Front. Cell Dev. Biol.* 9, 762828. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.762828>
- Zhu, C., Kim, K., Wang, X., Bartolome, A., Salomao, M., Dongiovanni, P., Meroni, M., Graham, M.J., Yates, K.P., Diehl, A.M., Schwabe, R.F., Tabas, I., Valenti, L., Lavine, J.E., Pajvani, U.B., 2018. Hepatocyte Notch activation induces liver fibrosis in nonalcoholic steatohepatitis. *Sci. Transl. Med.* 10, eaat0344. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aat0344>
- Zindel, J., Kubes, P., 2020. DAMPs, PAMPs, and LAMPs in Immunity and Sterile Inflammation. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* 15, 493–518. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathmechdis-012419-032847>

ANNEXE

Expression of NKG2D ligands is downregulated by β -catenin signalling and associates with HCC aggressiveness.

Mathilde Cadoux, Stefano Caruso, Sandrine Pham, Angélique Gougelet, Céline Pophillat, Rozenn Riou, Robin Loesch, Sabine Colnot, Công Trung Nguyen, Julien Calderaro, Séverine Celton-Morizur, Nadia Guerra, Jessica Zucman-Rossi, Chantal Desdouets, Jean-Pierre Couty. *Journal of Hepatology*. 2021 Jun;74(6):1386-1397. doi: 10.1016/j.jhep.2021.01.017. Epub 2021 Jan 21. PMID: 33484773.



Expression of NKG2D ligands is downregulated by β -catenin signalling and associates with HCC aggressiveness

Mathilde Cadoux¹, Stefano Caruso², Sandrine Pham¹, Angélique Gougelet³, Céline Pophillat¹, Rozenn Riou³, Robin Loesch³, Sabine Colnot³, Công Trung Nguyen⁵, Julien Calderaro⁵, Séverine Celton-Morizur¹, Nadia Guerra⁴, Jessica Zucman-Rossi², Chantal Desdouets¹, Jean-Pierre Couty^{1,*}

¹Centre de Recherche des Cordeliers, INSERM, Sorbonne Université, Université de Paris, Team Proliferation Stress and Liver Physiopathology, F-75006 Paris, France; ²Centre de Recherche des Cordeliers, INSERM, Sorbonne Université, Université de Paris, Functional genomics of solid tumors Team, Labex Immuno-Oncology, Paris, France; ³Centre de Recherche des Cordeliers, INSERM, Sorbonne Université, Université de Paris, Oncogenic functions of β -catenin signalling in the liver team F-75006 Paris, France; ⁴Department of Life Sciences, Imperial College London, London, United Kingdom; ⁵Institut Mondor de Recherche Biomédicale, INSERM U955, Créteil, France

Background & Aims: The NKG2D system is a potent immunosurveillance mechanism in cancer, wherein the activating NK cell receptor (NKG2D) on immune cells recognises its cognate ligands on tumour cells. Herein, we evaluated the expression of NKG2D ligands in hepatocellular carcinoma (HCC), in both humans and mice, taking the genomic features of HCC tumours into account.

Methods: The expression of NKG2D ligands (*MICA*, *MICB*, *ULBP1* and *ULBP2*) was analysed in large human HCC datasets by Fluidigm TaqMan and RNA-seq methods, and in 2 mouse models (mRNA and protein levels) reproducing the features of both major groups of human tumours.

Results: We provide compelling evidence that expression of the *MICA* and *MICB* ligands in human HCC is associated with tumour aggressiveness and poor patient outcome. We also found that the expression of *ULBP1* and *ULBP2* was associated with poor patient outcome, and was downregulated in *CTNNB1*-mutated HCCs displaying low levels of inflammation and associated with a better prognosis. We also found an inverse correlation between *ULBP1/2* expression levels and the expression of β -catenin target genes in patients with HCC, suggesting a role for β -catenin signalling in inhibiting expression. We showed in HCC mouse models that β -catenin signalling downregulated the expression of Rae-1 NKG2D ligands, orthologs of *ULBPs*, through TCF4 binding.

Conclusions: We demonstrate that the expression of NKG2D ligands is associated with aggressive liver tumorigenesis and that the downregulation of these ligands by β -catenin signalling may account for the less aggressive phenotype of *CTNNB1*-mutated HCC tumours.

Lay summary: The NKG2D system is a potent immunosurveillance mechanism in cancer. However, its role in hepatocellular carcinoma development has not been widely

investigated. Herein, we should that the expression of NKG2D ligands by tumour cells is associated with a more aggressive tumour subtype.

© 2021 European Association for the Study of the Liver. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

Introduction

Hepatocellular carcinoma (HCC) is the fourth leading cause of cancer-related death and the fifth most common cancer worldwide.¹ It is responsible for approximately 800,000 deaths each year. About 90% of HCCs develop on a background of chronic liver disease.² Nevertheless, in <10% of cases, HCC develops in healthy livers.^{3,4} The most common risk factors for HCC are infections with hepatotropic viruses (HBV, HCV), alcohol consumption, aflatoxin B1 exposure, haemochromatosis and metabolic syndrome, which is frequently seen in patients with diabetes and/or obesity.⁴ Cirrhosis, the final stage of chronic liver disease, remains the main risk factor for HCC development in Western countries.⁵ Our understanding of HCC pathogenesis has increased steadily over the last 20 years. Functional genomics studies have recently provided an accurate picture of the landscape of genetic alterations and identified the core pathways deregulated in HCC.⁶ The most prevalent mutations after those of the *TERT* promoter concern *TP53* and *CTNNB1*,^{5,7} defining 2 major groups of tumours with specific features. *TP53*-mutated HCCs are aggressive proliferating tumours with high levels of inflammation (hot tumours) and genomic instability. Conversely, HCCs with activating mutations of *CTNNB1* (*CTNNB1*-mutated HCCs) have a less severe phenotype associated with a favourable prognosis and low levels of proliferation and inflammation (cold tumours).

Treatment options for HCC remain very limited. Most involve multi-targeted tyrosine kinase inhibitors, providing little survival benefit over best supportive care.⁸ The major role of the immune system in controlling tumour growth and metastasis provides the basis for most cancer immunotherapies. Immune checkpoint blockade, based on inhibitors of PD-1 and/or CTLA-4, is considered an exciting approach for HCC treatment (for review⁹). However, only 25% of HCCs are eligible for immunotherapy, as they express markers of an inflammatory response.¹⁰ Recent

Keywords: NKG2D ligands; hepatocellular carcinoma; HCC; β -catenin-signalling.
Received 18 December 2019; received in revised form 30 December 2020; accepted 7 January 2021; available online 21 January 2021

* Corresponding author. Address: Centre de Recherche des Cordeliers (CRC), UMRS INSERM U1138, Sorbonne Université, USPC, Université de Paris, F-75006 Paris, France, Département Génome et Cancer, Building A, 15 Rue de L'Ecole de Médecine, 75006 Paris, France; Tel.: 33 1 44 27 69 06.

E-mail address: jean-pierre.couty@inserm.fr (J.-P. Couty).

<https://doi.org/10.1016/j.jhep.2021.01.017>



findings suggest that *CTNNB1*-mutated HCCs displaying β -catenin activation are associated with immune escape and resistance to anti-PD-1 therapy.^{11,12} New therapeutic strategies based on our understanding of the tumour and its relationship with its immune microenvironment are, therefore, urgently required to improve HCC treatment.

With regards to cancer surveillance, the NKG2D-ligand/NKG2D pathway has been the subject of intense research in cancer, infection and autoimmunity.¹³ The activating receptor NKG2D, which was discovered more than 20 years ago, initially on the surface of natural killer (NK), has proved to be a critical player in the immune surveillance of cancer. The NKG2D-dependent elimination of tumour cells expressing at least 1 cognate ligand is well documented in both *in vitro*^{14–17} and *in vivo* models of transplanted tumours.^{18–21} The induction and upregulation of NKG2D ligands result from various stress signals, including infection, DNA damage, heat shock and hyperproliferation.^{22,23}

The expression of NKG2D ligands has been observed in various human cancers. These ligands are cell surface proteins structurally related to the major histocompatibility complex (MHC). In humans, the 2 most studied NKG2D ligands are MHC class-I-related chain A and B, the MICA and MICB proteins. There are also 6, less studied, unique long 16 (UL-16)-binding proteins (ULBP1–6).²⁴ Their counterparts in mice are the retinoic acid early inducible gene-1 *Rae-1 α - ϵ* (orthologous to ULBPs), minor histocompatibility H60a-c and murine UL16-binding protein-like transcript (MULT1) proteins. In humans, variable levels of MICA, MICB and ULBP1–3 ligand expression have been observed in haematopoietic malignancies, including acute and chronic leukaemias (of lymphoid and myeloid origin),²⁵ and in solid tumours.^{26–30} Ligand expression is heterogeneous between cancer types and individuals. Several studies have highlighted the paradoxical relationship between ligand expression and patient outcome. Briefly, high levels of cell surface ligand expression are associated with better disease-free survival in colorectal,³¹ cervical³² and nasopharyngeal carcinomas,³³ but with poor prognosis in breast,³⁴ lung³⁵ and ovarian cancers.³⁶ The expression of NKG2D ligands in HCC remains insufficiently explored, as conflicting data have been obtained concerning the potentially beneficial or deleterious role of NKG2D in HCC.¹³

In this study, we investigated the expression of the NKG2D ligand genes *MICA/B* and *ULBP1/2* in a large human HCC dataset and in 2 mouse models reproducing the features of both types of human tumours.

Methods

Patients and tumour material

Human liver samples

A series of 354 liver tumour samples, including 10 early HCCs, 337 HCCs and 7 malignant transformations of HCA (hepatocellular adenoma) into HCC (HCC on HCA), were collected from 325 patients treated surgically in Europe. The study was approved by the appropriate institutional review boards (CCPRB Paris Saint-Louis, 1997, 2004 and 2010, approval number 01-037; Bordeaux, 2010-A00498-31) and all patients gave informed consent in accordance with French law. All samples were immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C . Clinical data, biological and histological parameters are described in Table 1 and the supplementary materials.

Table 1. Details of the cohort of HCC patients (354) studied in Fluidigm experiments (e.g. MICA/MICB).

Variables	Data available, n	Numbers (%), Median (Min-Max)
Analysis per patient (n = 325)		
Age, years	324	64 (18-90)
Sex, male	324	267 (82.4%)
Hepatitis B	323	63 (19.5%)
Hepatitis C	324	68 (21%)
High alcohol intake	324	147 (45.4%)
Metabolic syndrome	321	50 (15.6%)
Without aetiology	324	43 (13.3%)
AFP <20 ng/ml	306	129 (42.2%)
Analysis per tumour (n = 354)		
Histological diagnosis		
Early HCC	354	10 (2.8%)
HCC on HCA		7 (2%)
HCC		337 (95.2%)
Metavir score (fibrosis of non-tumour liver)		
F0-F1	354	114 (32.2%)
F2-F3		86 (24.3%)
F4		154 (43.5%)
G1-G6 subclass		
G1	353	26 (7.4%)
G2		39 (11.1%)
G3		47 (13.3%)
G4		125 (35.4%)
G5		70 (19.8%)
G6		46 (13%)
Edmondson III-IV	348	185 (53.2%)
WHO differentiation		
Good	348	106 (30.5%)
Medium		194 (55.7%)
Bad		48 (13.8%)
5-gene score		
Good	353	226 (64%)
Bad		127 (36%)
<i>TERT</i> promoter mutations	338	214 (63.3%)
<i>CTNNB1</i> mutations	339	125 (36.9%)
<i>TP53</i> mutations	347	61 (17.6%)

Quantitative RT-PCR and RNA-sequencing

We assessed mRNA levels by quantitative reverse transcription (RT)-PCR on 354 HCC samples. We reverse transcribed 500 ng of total RNA with the High-Capacity Transcription Kit (Life Technologies) and assessed gene expression in predesigned TaqMan assays (*MICA*: Hs00741286_m1; *MICB*: Hs00792952_m1; *ATM*: Hs01112326_m1; *ATR*: Hs00354807_m1; Life Technologies) on Fluidigm 96 dynamic arrays with the Bio-Mark Real-Time PCR system. Expression levels (Ct values) were assessed with Fluidigm Real-Time PCR Analysis software (4.1.3) and gene expression data were expressed by the $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ method, relative to ribosomal 18S (R18S) and the expression level of the corresponding gene in 5 normal liver samples. Published RNA-seq data for 200 tumours were used to evaluate *ULBP1* and *ULBP2* expression in HCC patients (see Table 2).^{40,41} The sequencing data reported in this paper have been deposited in the EGA (European Genome-phenome Archive) database under accession numbers EGAS00001002879, EGAS00001001284 and EGAS00001003837.

Mice and HCC induction

All animal studies were approved by the *Ministère de l'Enseignement Supérieur, de la Recherche et de l'Innovation* (MESRI) and the *Direction Départementale des Services Vétérinaires de Paris* (agreement no. 75-956) and by the Mouse Facility Core

Table 2. Details of the cohort of patients with HCC for whom RNA-sequencing data were available for the analysis of *ULBP1* and *ULBP2* expression.

Variable	LICA-FR (n = 200)	
	n	Total (%)
Age, years (min-max)	200	64 (18–94)
Sex, male	200	157 (79)
Aetiology		
Alcohol	198	72 (36)
Hepatitis B	200	52 (26)
Hepatitis C	198	31 (16)
Metabolic syndrome	196	39 (20)
Unknown	199	25 (13)
Fibrosis stage	200	
F0-F1		92 (46)
F2-F3		45 (22.5)
F4		63 (31.5)
Edmonson grading	200	
I-II		59 (20)
III-IV		139 (70)
G1-G6 subclass	197	
G1		24 (12)
G2		28 (14)
G3		50 (25)
G4		40 (20)
G5		31 (16)
G6		24 (12)
WHO differentiation	177	
Good		32 (18)
Medium		106 (60)
Bad		39 (22)
5-gene score	181	
P1		87 (48)
P2		94 (52)
<i>TERT</i> promoter mutations	198	
<i>CTNNB1</i> mutations	200	
<i>TP53</i> mutations	200	

laboratories (CRC UMRS1138). All mice (strain C57Bl6J) were kept in well-controlled animal housing facilities and had free access to tap water and food pellets.

The various HCC mouse models used here to model HCC tumorigenesis (strain C57Bl6J) have been described elsewhere.⁴² *Lpk-myc+* transgenic mice, which express the *c-myc* oncogene in the liver under the control of rat L-PK regulatory regions, developed HCC with *Cttnb1* mutations; we established homogeneous groups of these mice consisting exclusively of littermates.⁴³ In our study, the *Lpk-myc+* model is referred to here as the β -catenin mutated HCC model. In this model, unlike the intestine, in which the *c-myc* oncogene is a crucial target of the Wnt signalling pathway driving tumorigenesis, studies with a combination of several molecular approaches (chromatin immunoprecipitation [ChIP]-seq, RNA-Seq) showed that *c-myc* was not a target of Wnt signalling in the liver. In this model, *c-myc* and β -catenin signalling co-operate to drive liver carcinogenesis, and all *Lpk-c-myc* tumours harbour *Cttnb1*-activating mutations.⁴³

Cohorts of male age-matched wild-type mice received a single intraperitoneal injection of diethylnitrosamine (DEN) (Sigma) (25 mg kg⁻¹ body weight) to induce HCC, or PBS, at 14 days of age.⁴⁴ HCC development was studied at 12 to 14 months in *Lpk-myc+* mice and mice with DEN-induced HCC.

We also analysed Wnt/ β -catenin signalling through inducible hepatocyte-specific inactivation of the *Apc* gene, in *Apc* ^{Δ Hep}

(*Apc*^{fllox/fllox}, *TTR-Cre Tam*) mice; the control mice in this case were *Apc*^{fllox/fllox}, Cre-negative.^{42,45–47} This model reproduces the initial step of β -catenin oncogenesis and is based on tamoxifen-inducible hepatospecific inactivation of the tumour suppressor gene adenomatous polyposis coli (*Apc*^{-/-}). All hepatocytes of the liver lobule display aberrant β -catenin activation after tamoxifen injection. The *Apc* gene was inactivated by a single i.p. injection of 1.5 mg tamoxifen (MP Biomedicals, France) in 9- to 12-week-old mice.^{42,45–47}

Non-parenchymal cell isolation and flow cytometry

Livers were harvested and the non-parenchymal cell (NPC) fraction was extracted on a Percoll gradient, as previously described.^{42,47}

Cells were incubated with anti-CD16/CD32 antibodies (Fc γ III/II receptor, clone 2.4G2, eBiosciences) before staining with labelled antibodies, according to the manufacturer's recommendations. Cells were subjected to fluorescence-activated cell sorting (FACS) analysis with the following antibodies: anti-CD45/Ly5 (30-F11), anti-TCR chain (H57-597), anti-NK1.1 (PK136), anti-CD4 (RM4-5), anti-CD8 α (53-6.7) and anti-NKG2D (CX5) antibodies, all purchased from BD Pharmingen/Horizon or from eBioscience. CD1d- α -galactosylceramide-loaded (CD1d- α -GalCer-loaded) tetramers (APC-labelled) for the identification of invariant NKT cells were provided by the NIH Tetramer Core Facility, Bethesda Maryland USA. Data were acquired with a Fortessa FACS flow cytometer (BD Biosciences) and analysed with FlowJo software (Tree Star Inc.).

Preparation of total RNA and quantitative PCR analysis

Total RNA was extracted from mouse liver tissue or cell lines (AML12 and Hepa1.6) with TRIzol (Invitrogen), and 2 μ g was used as a template for cDNA synthesis (MMLV, Life Technologies). Purified RNA was then reverse transcribed with the High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems). Real-time PCR was performed with the Fast Start Quantitative PCR (q-PCR) kit with SYBR Luminaris Color HiGreen qPCR master mix (Thermo Fisher Scientific) and specific primers. The reactions were performed in 96-well plates in a LightCycler 480 instrument (Roche) with 40 cycles. We determined the relative amounts of the mRNAs studied by the second-derivative maximum method, with LightCycler 480 analysis software and normalization against 18s rRNA, used as an invariant control for all studies. Data are expressed as means \pm standard deviation of the mean. The statistical significance of differences was assessed in Students *t* test in Prism 5.0 software (GraphPad Software, San Diego, CA). *p* values <0.05 were considered statistically significant.

Immunohistochemistry

Tissues were fixed by incubation in 4% formalin overnight at 4°C, and were then embedded in paraffin wax. For immunohistochemistry, liver sections (5 μ m) were deparaffinised. Antigen retrieval was performed by incubating liver sections in Tris-based buffer (Vector Laboratories) in a microwave at 850 Watts for 20 min after boiling. Tissue sections were blocked by incubation with the Avidin/Biotin blocking kit (Vector Laboratories) for 15 min each at room temperature and with normal horse serum (2.5%) for 20 min at room temperature. Tissue sections were then incubated overnight at 4°C with the anti-Rae1 pan-specific antibody (R&D AF1136) at a concentration of 10 μ g/ml or

with antibodies directed against glutamine synthase (BD Transduction Laboratories, clone 6, 1/400). Endogenous peroxidase was blocked by treating the sections with 3% hydrogen peroxide for 20 min at room temperature. Tissue sections were incubated with biotinylated anti-goat IgG antibody (1:250 dilution, Vector Laboratories, CA, USA) for 30 minutes. Specific binding was detected with the ABC reagent (Vector Laboratories) and DAB (Vector Laboratories) and the slides were counterstained with haematoxylin.

TCF4 ChIP-sequencing

The ChIP protocol was adapted from a previous study,⁴⁸ as previously described.⁴⁹ The ChIP-seq data were deposited under accession number GSE35213 in the Gene Expression Omnibus database. β -catenin and TCF-4 binding to the *Rae* promoter, relative to the immunoglobulin isotype control, was assessed on the basis of SYBR green fluorescence, with the following oligonucleotides: FW- GACTTCCACAAACGCACAA, Rev- GAAACTGCCCGTTACCAC designed according to the sequence of the TCF-4 peak identified upstream from the *Rae-1* gene.

Editing of *Cttnb1* Exon 3 with CRISPR-Cas 9 technology

We purchased the murine hepatocyte cell line AML12 cell line from ATCC-CRL-2254TM. AML12 cells were cultured in DMEM/F-12 (1:1) + GlutaMAX, supplemented with 10% heat-inactivated FCS and antibiotics. The exon 3 region of *CTNNB1* was deleted with CRISPR-Cas9 technology, leading to activation of β -catenin signalling. Clones with deletions of exon 3 were selected on puromycin and were passaged more than 10 times. Cells were harvested and collected for RNA extraction, as described above.

Silencing of *Cttnb1* by a siRNA strategy in *Cttnb1*-mutated Hepa1.6 cells

Hepa 1.6 cells (ATCC, CRL-1830) harbouring *Cttnb1*-activating mutations were cultured in DMEM supplemented with 5% heat-inactivated FCS. They were plated at a density of 300,000 cells per well and transfected 1 day later with 20 nM small-interfering RNA (siRNA) against β -catenin (QiagenSI00942039) or a control siRNA (Dharmacon D-001210-01-05) in the presence of Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific). Molecular analyses were performed 72 h post transfection. Total RNA was extracted with TRIzol[®] reagent (Thermo Fisher Scientific), as described above.

Statistical analysis

Data were visualized and statistical analyses were performed with PRISM software (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA) and R software version 3.5.1 (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org>) with the Bioconductor package. Comparisons of continuous variables between ≥ 2 groups were performed with Mann-Whitney tests. Correlations between continuous variables were assessed by Pearson's correlation tests if both variables were normally distributed and the assumptions of linearity and homoscedasticity were respected, or by Spearman's rank correlation tests. All tests were 2-tailed and *p* values <0.05 were considered significant.

Ethics approval

The study was approved by the competent institutional review boards (CCPRB Paris Saint Louis, 1997, 2004 and 2010).

Results

Expression of the NKG2D ligands, *MICA* and *MICB*, in human HCC is associated with tumour aggressiveness and poor patient outcome

We investigated the possible association of *MICA* and *MICB* expression with specific clinical features of HCC, using RT-qPCR analyses on 354 patient samples (Table 1).³⁷ We first determined the expression levels of these genes by diagnosis, as follows: early HCC (n = 10), HCC emerging from HCA (HCC on HCA; n = 7) and HCC (n = 337), with normal liver samples (n = 5) as a control (Fig. 1A). We found that both *MICA* and *MICB* were significantly more strongly expressed in early HCC and HCC/HCA than in normal liver (n = 5). Moreover, both *MICA* and *MICB* were more strongly expressed in HCC than in early HCC and HCC on HCA (Fig. 1A). We also checked that the levels of expression of *MICA* and *MICB* were positively correlated (R = 0.677, *p* <0.0001) suggesting that these 2 genes located in the HLA class I region of chromosome 6 are co-induced during liver tumorigenesis (Fig. S1A). We then evaluated the expression of *MICA* and *MICB* in HCC as a function of Edmondson-Steiner grade criteria, distinguishing 4 specific liver cancer stages and depicting tumour cell differentiation. We found that the expression of both *MICA* and *MICB* was positively associated with tumour grade and low levels of differentiation (Fig. 1B, Fig. S1B). These ligands are known to be regulated principally at the transcriptional level.²³

Finally, we used a 5-gene molecular score to predict the outcome of patients with HCC,⁵⁰ identifying 2 groups of HCC: P1, corresponding to HCC with a good prognosis and P2, corresponding to HCC associated with bad prognosis and early tumour recurrence. Interestingly, patients with HCC and poor outcomes displayed the highest levels of expression of both *MICA* and *MICB* (Fig. 1C).

Collectively, our data show that the expression of the NKG2D ligands *MICA* and *MICB* in human HCC is associated with tumour aggressiveness and poor patient outcome.

NKG2D ligands *MICA* and *MICB* are less strongly expressed in HCCs displaying chromosomal stability

We investigated whether the expression of *MICA/B* was associated with specific genetic alterations, by evaluating *MICA* and *MICB* expression as a function of the molecular classification of human HCCs.⁵¹ This classification distinguishes 3 groups, G1 to G3, characterised by aggressive HCC tumours with high levels of chromosomal instability and *TP53* mutations,^{38,51} and 3 groups, G4 to G6, associated with a better prognosis, chromosomal stability and a well-differentiated tumour phenotype. *CTNNB1*-mutated HCCs belong to groups G5-G6 and have no inflammatory infiltrates. We found that the expression levels of both *MICA* and *MICB* were significantly lower in HCC samples from groups G4 to G6 than in samples from groups G1 to G3 (Fig. 2A).

We also studied *MICA* and *MICB* expression levels as a function of the presence or absence of prevalent mutations (*TERT*, *TP53*, *CTNNB1*) within the landscape of genetic alterations of HCC.^{5,52} We found that *TP53*-mutated HCCs had significantly higher levels of *MICA/B* expression than non-mutated HCCs (Fig. 2C). The expression of these genes did not differ significantly between HCCs with and without *CTNNB1* or *TERT* mutations (Fig. 2C, Fig. S1A, respectively).

Finally, as tumours with *TP53* mutations are known to display chromosomal instability leading to high levels of DNA damage,

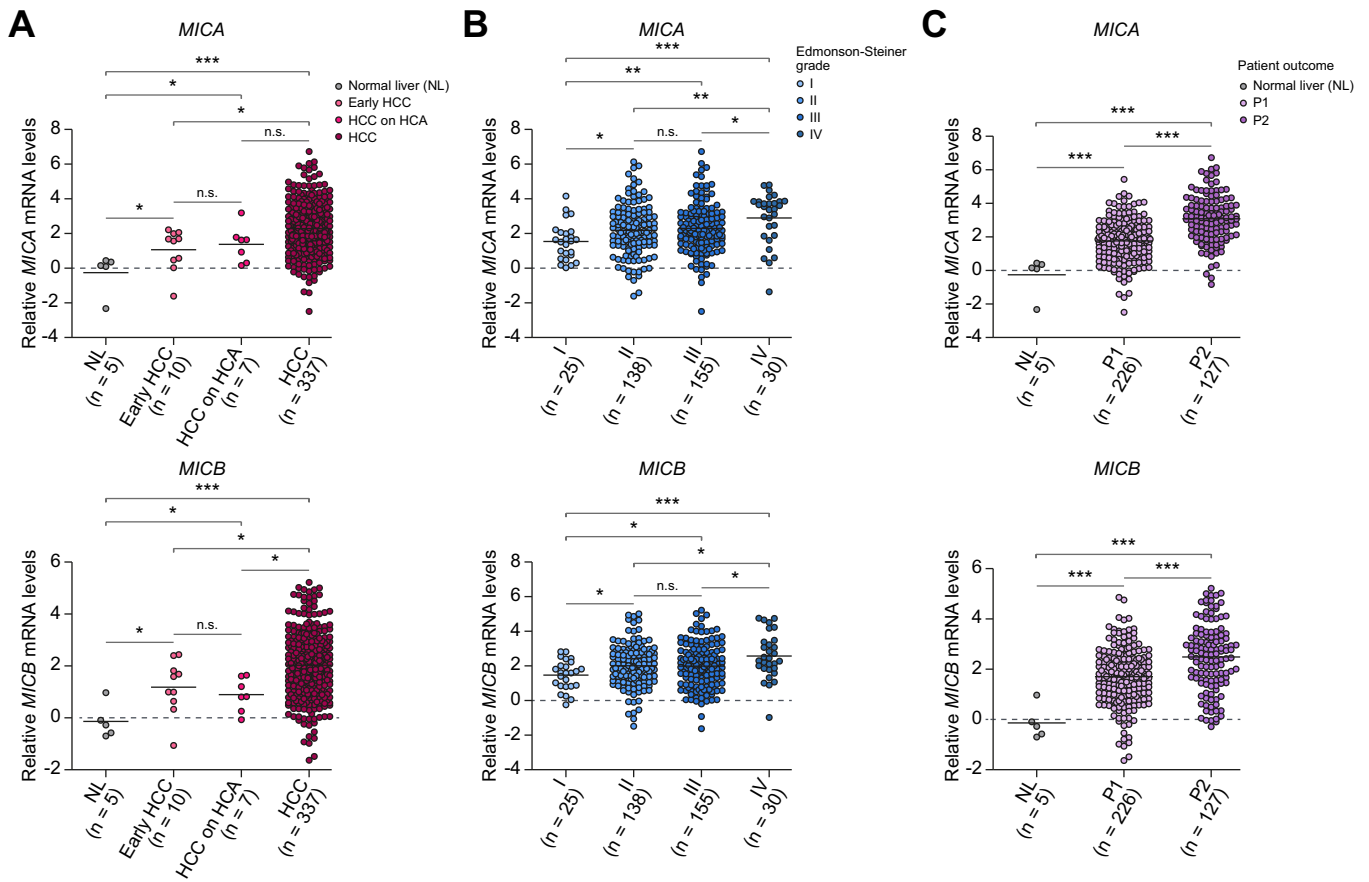


Fig. 1. MICA and MICB expression is upregulated during human HCC development and strongly associated with tumour grade. (A) The levels of mRNA for NKG2D ligands (*MICA* and *MICB*) were assessed in NL (n = 5), early HCC (n = 10), HCC on HCA (n = 7), and HCC (n = 337). The fold-change (\log_2) in gene expression is presented relative to the level of expression in normal liver. The black lines correspond to the mean values in normal liver. The significance of differences in expression was assessed in Mann-Whitney tests: n.s.; * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$. (B) The levels of mRNA for NKG2D ligands (*MICA* and *MICB*) were determined in HCCs classified according to Edmondson-Steiner grade. Grade I = very well differentiated; Grade II = moderately differentiated, Grade III = poorly differentiated; Grade IV = undifferentiated HCC. The fold-change (\log_2) in gene expression is presented relative to the level of expression in normal liver. The black lines correspond to the mean values. The significance of differences in expression was assessed in Mann-Whitney tests: non-significant, n.s.; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. (C) The levels of mRNA for NKG2D ligands (*MICA* and *MICB*) were determined in NL (n = 5) and in HCC, with a 5-gene molecular score used to predict the outcome of patients. P1 (n = 226) and P2 (n = 127). The fold-change (\log_2) in gene expression is presented relative to the level of expression in normal liver. The black lines correspond to the mean values. The significance of differences in expression was assessed in Mann-Whitney tests: n.s.; * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$. HCA, hepatocellular adenoma; HCC, hepatocellular carcinoma; NL, normal liver. (This figure appears in color on the web.)

we investigated the relationship between the expression of *MICA/B* and expression of the *ATM/ATR* genes, 2 master regulators of the DNA damage response known to regulate the expression of NKG2D ligands.²³

We found a positive correlation between the levels of expression of the *MICA/B* and *ATM/ATR* genes (Fig. S2B). Our data show that *MICA/B* are more strongly expressed in HCCs with *TP53* mutations and chromosomal instability, and that their expression is correlated with that of DNA damage repair-related genes.

Expression of *ULBP1/2* ligands in human HCCs is weaker in tumours with stable chromosomes than in those displaying chromosomal instability and is associated with *CTNNB1* mutation status

We extended our analysis to the expression of *ULBP* ligands, which have been little studied in HCC. We investigated whether the expression of *ULBPs* had characteristics in common with the expression of *MICA/B*, by comparing the expression of *ULBP1* and

2 according to our previous RNA-seq dataset with the molecular classification of human HCCs.⁴⁰ As for *MICA/B*, we found that the expression levels of the *ULBP1* and *ULBP2* genes were correlated ($R = 0.49, p < 0.0001$) (Fig. S3A). Moreover, although not significant, the expression levels of both *ULBP1* and 2 tended to be higher in HCC tumours with lower levels of differentiation and higher grades (Fig. S3B, C).

Using the 5-gene molecular score predicting the outcome of patients with HCC,⁵⁰ we found that those with poor outcomes displayed the highest levels of expression for both *ULBP1* and *ULBP2* (Fig. 3A). Moreover, the level of expression of these genes was significantly lower in groups G4 to G6 than in HCCs displaying chromosomal instability (groups G1 to G3) and was lower than that in normal livers (Fig. S4A). An analysis of the expression of *ULBP1/2* in HCC samples as a function of mutational status showed that *ULBP1/2* expression levels were significantly higher in HCCs with *TP53* mutations than in HCCs without such mutations (Fig. 3B), but that there was no significant difference

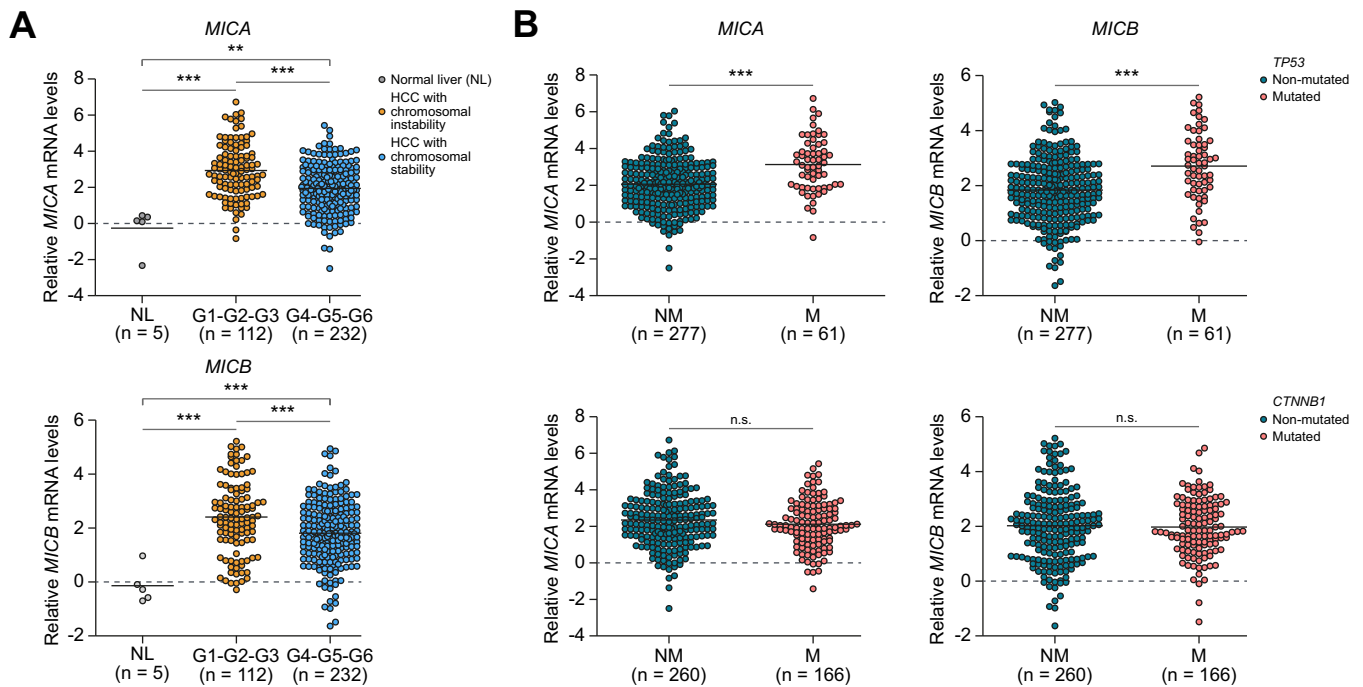


Fig. 2. The expression of *MICA* and *MICB* is strongly upregulated in group G1/G2/G3 HCCs and is weaker in group G4/G5/G6 HCCs displaying chromosomal stability. (A) The levels of mRNA for NKG2D ligands (*MICA* and *MICB*) were assessed in normal liver (NL) (n = 5), G1/G2/G3 (n = 112), and G4/G5/G6 (n = 232) HCCs. The fold-change (\log_2) in gene expression is presented relative to the level of expression in normal liver. The black lines correspond to the mean values. The significance of differences in expression was assessed in Mann-Whitney tests: n.s.; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. (B) The levels of mRNA for NKG2D ligands (*MICA* and *MICB*) were assessed in HCCs with (n = 61) and without (n = 277) *TP53* mutations, and in HCCs with (n = 166) and without (n = 260) *CTNNB1* mutations. The fold-change (\log_2) in gene expression is presented relative to the level of expression in normal liver. The black lines correspond to the mean values. The significance of differences in expression was assessed in Mann-Whitney tests: n.s.; *** $p < 0.001$. HCC, hepatocellular carcinoma; NL, normal liver. (This figure appears in color on the web.)

between HCCs with and without *TERT* mutations, as for *MICA/B* (Fig. S4B). Interestingly, *ULBP1/2* expression levels were significantly lower in HCCs with *CTNNB1* mutations, suggesting that β -catenin signalling may downregulate the expression of *ULBP1/2* ligands (Fig. 3B). Consistent with these observations, we found that *ULBP1* expression was inversely correlated with the expression levels of 3 positive β -catenin target genes: *GLUL*, *LGR5* and *TBX3* (Fig. 3C).

Collectively, these findings indicate that the level of expression of *ULBP1/2* ligands in human HCCs is higher in tumours with *TP53* mutations and lower in those with *CTNNB1* mutations, suggesting that β -catenin signalling downregulates the expression of these genes.

***CTNNB1*-mutated HCCs in mice have low levels of NKG2D ligand expression**

We investigated the molecular mechanisms regulating the expression of NKG2D ligands in 2 mouse models of liver tumorigenesis reproducing the features of the 2 major groups of human HCCs. The DEN-induced HCC model mimics aggressive unstable tumours displaying preferential Ras mutation and without *Cttnb1*-activating mutations,⁴⁴ whereas the Lpk-myc+ model mimics HCC tumours with *Cttnb1* mutations and stable chromosomes.^{42,43,47} We evaluated the level of expression of NKG2D ligands in these models. Consistent with human data, we found that mRNA levels for the mouse NKG2D ligands (*Rae-1 δ* , *Rae-1 ϵ* , human *ULBP* orthologs) were strongly upregulated in aggressive HCCs relative to control livers without tumours (Fig. 4A). However, as in human HCC, the expression of these ligands was strongly downregulated in HCCs with *Cttnb1* mutations, suggesting a role

for β -catenin signalling in this downregulation (Fig. 4A). Furthermore, the NKG2D (Klrk1) receptor was significantly upregulated on lymphocytes (in terms of the percentage of cells expressing this receptor and the expression level per cell) in HCCs with *Cttnb1* mutations relative to DEN-induced HCCs (Fig. S5).

We performed additional investigations with the *Apc*-knockout (KO) mouse model (*Apc* ^{Δ Hep}), in which the β -catenin pathway is activated in all hepatocytes (without *Cttnb1* mutation).^{42,45,46} We found that mRNA levels for NKG2D ligands (*Rae-1 δ* , *Rae-1 ϵ*) were significantly downregulated in *Apc* ^{Δ Hep} livers relative to livers in which β -catenin signalling was not activated (Fig. 4B). We validated our observations at the protein level, by immunohistochemical staining of *Rae-1* on paraffin-embedded liver sections. We found that *Rae-1* ligands were not expressed in specific areas in which β -catenin signalling was turned on (stained for glutamine synthase, a target of β -catenin) in control livers (Fig. 4C). *Rae-1* ligands were expressed in hepatocytes, except for those surrounding the pericentral vein (constitutive activation of β -catenin signalling), absent from hepatocytes in which *Apc* was knocked out and in tumour hepatocytes with *Cttnb1* mutations, but expressed in HCCs without mutations affecting β -catenin (DEN-induced HCC).

Collectively, these data strongly suggest that β -catenin signalling downregulates the expression of *Rae-1* NKG2D ligands in hepatocytes.

β -catenin inhibits *Rae-1* NKG2D ligands by binding to TCF4 on the *Rae1*-promoter

We investigated the molecular mechanisms of β -catenin-mediated *Rae1* downregulation, by performing ChIP-Seq experiments on purified primary hepatocytes displaying β -catenin activation

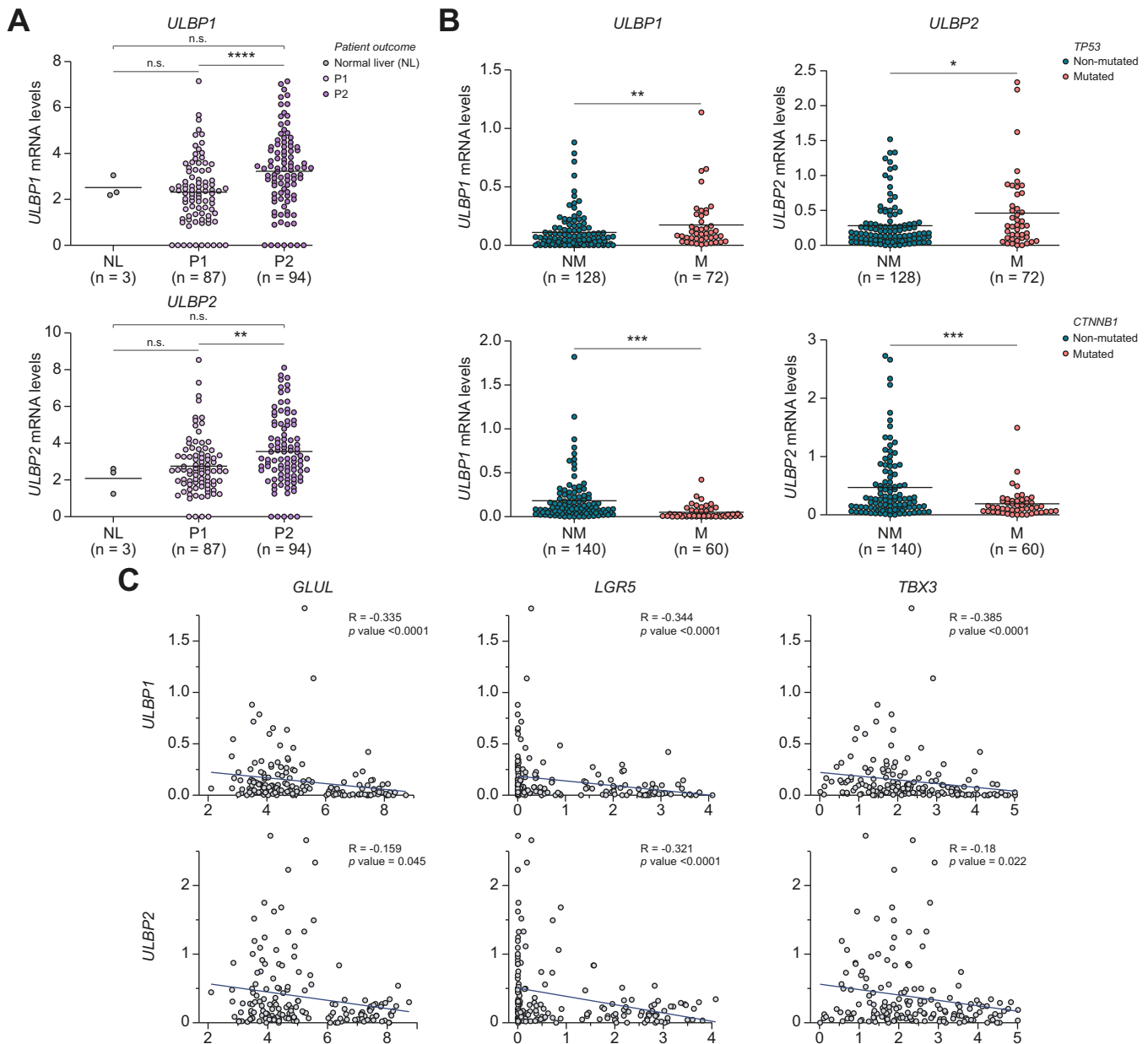


Fig. 3. The expression of *ULBP1* and *ULBP2* is specifically downregulated in groups of HCCs with stable chromosomes. (A) The levels of mRNA for NKG2D ligands (*ULBP1* and *ULBP2*) were assessed in NL (n = 3) and in HCC, with a 5-gene molecular score used to predict patient outcome. P1 (n = 87) and P2 (n = 94). The fold-change (\log_2) in gene expression is presented relative to the level of expression in normal liver. The black lines correspond to the mean values. The significance of differences in expression was assessed in Mann-Whitney tests: n.s.; * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$. (B) The levels of mRNA for NKG2D ligands (*ULBP1* and *ULBP2*) were assessed in HCCs with (n = 128) and without (n = 72) *TP53* mutations, and in HCCs with (n = 60) and without (n = 140) *CTNNB1* mutations. The fold-change (\log_2) in gene expression is presented relative to the level of expression in normal liver. The black lines correspond to the mean values. The significance of differences in expression was assessed in Mann-Whitney tests: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. (C) Correlation between the levels of mRNA for *ULBP1* and *ULBP2* and those for *GLUL*, *LGR5* or *TBX3* in human HCC samples (n = 354). Single values were plotted and Pearson's product-moment correlation coefficient was determined. Statistical significance was assessed in Student's *t* test. HCC, hepatocellular carcinoma; NL, normal liver. (This figure appears in color on the web.)

(*Apc*-KO, *Apc*^{ΔHep}) and control hepatocytes (GSE35213) (Fig. 5A). Beta-catenin has no DNA-binding domain. The ChIP-seq experiment was therefore performed with an antibody against the preferred partner of β-catenin in hepatocytes, TCF4.⁴⁹ The ChIP-seq data showed a significant induction of TCF4 binding to the *Rae-1* promoter region in hepatocytes displaying β-catenin activation (*Apc*-KO mouse model, *Apc*^{ΔHep}) than in control hepatocytes (Fig. 5A). We confirmed this enrichment in TCF-4

binding upstream from the *Rae-1* promoter by ChIP-qPCR on another panel of *Apc*^{ΔHep} hepatocytes (Fig. 5A). These molecular data demonstrate that β-catenin directly inhibits the expression of *Rae-1* NKG2D ligands through binding to TCF4 on the *Rae-1* promoter in hepatocytes.

We used 2 different cellular systems to confirm that *Rae-1* ligand expression was a negative target of β-catenin signalling: a non-mutated hepatocyte cell line (αML) and a hepatoma cell

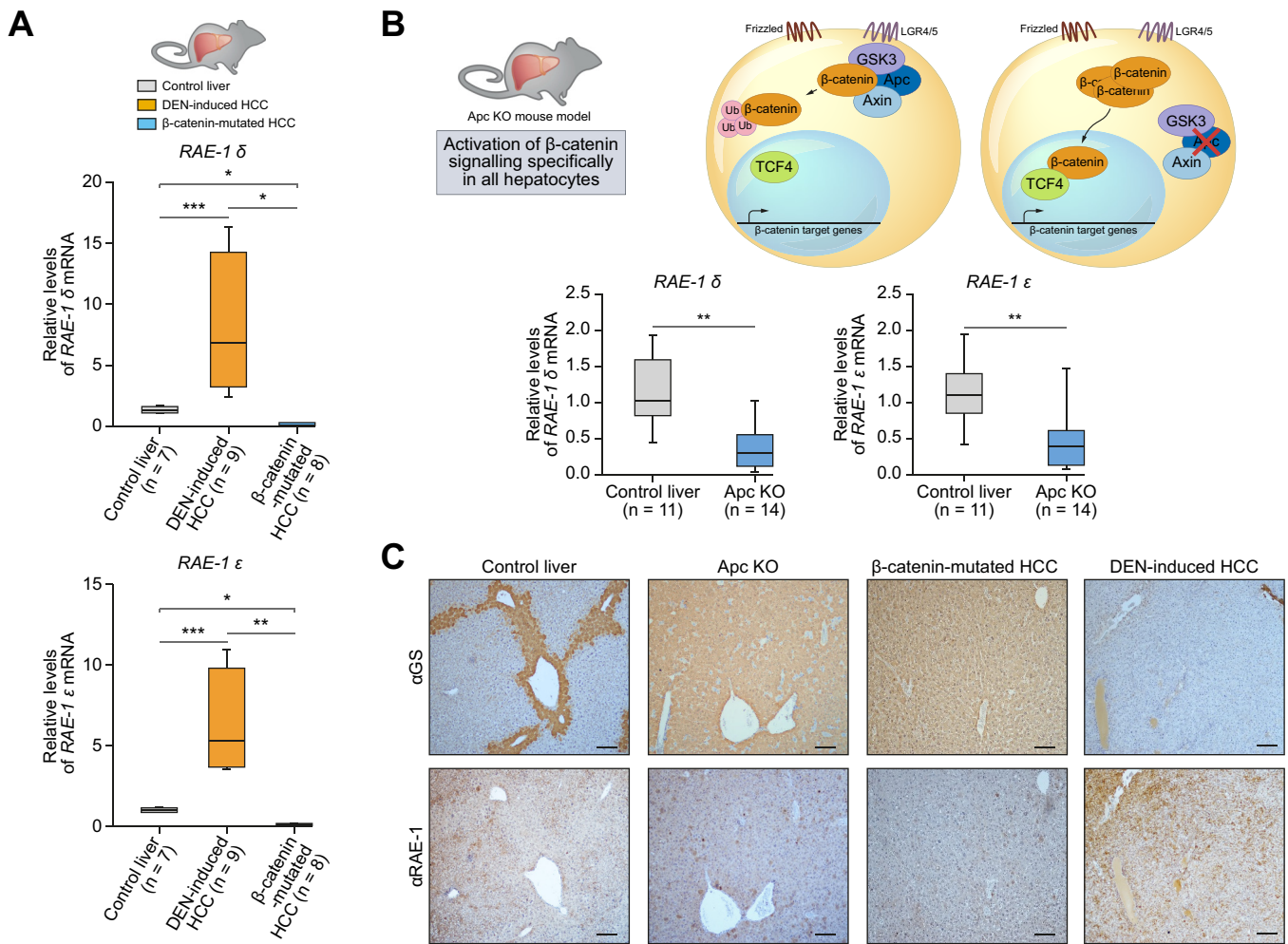


Fig. 4. Expression of the *Rae-1 δ* and *Rae-1 ε* NKG2D ligands is strongly downregulated in HCCs displaying β-catenin activation. (A) The levels of mRNA for NKG2D ligands (*Rae-1 δ* and *ε*) were assessed by RT-qPCR on DEN-induced HCC (n = 9), HCCs with β-catenin mutations (n = 8) and control liver (n = 7). Gene expression was normalized against 18s rRNA for each sample. Data are expressed as the mean ± SEM, with significance determined in Mann-Whitney tests: **p* < 0.05; ***p* < 0.01; ****p* < 0.001. (B) The levels of mRNA for NKG2D ligands (*Rae-1 δ* and *ε*) were assessed by RT-qPCR in Apc^{ΔHep} livers (n = 14) and control liver (n = 11). Gene expression was normalized against 18s rRNA for each sample. Data are expressed as the mean ± SEM, with significance determined in Mann-Whitney test: n.s.; ***p* < 0.01. (C) Paraffin-embedded liver sections obtained from Apc^{ΔHep}, DEN-induced HCCs, HCCs with β-catenin mutations (Lpk-myc+) and control livers were stained for glutamine synthase (GS) and Pan-Rae-1. Scale bars: 100 μm. DEN, diethylnitrosamine; HCC, hepatocellular carcinoma; RT-qPCR, quantitative reverse-transcription PCR. (This figure appears in color on the web.)

line (Hepa1.6) harbouring activating *Ctnnb1* mutations. We first edited exon 3 of the β-catenin gene with CRISPR-Cas9 technology in αML cells, to activate β-catenin signalling. A significant downregulation of Rae-1 ligands (*Rae-1δ*, *Rae-1ε*) was observed in β-catenin-activated αML cells relative to control αML cells, supporting the conclusions drawn from the ChIP-seq analysis (Fig. 5B). We then performed a siRNA experiment on the Hepa1.6 cell line, in which we showed that *Rae-1δ* expression was upregulated when β-catenin was silenced.

Overall, we provide strong evidence in both humans (*ULBP1/2*) and mice (*Rae-1*) that the expression of NKG2D ligands is significantly weaker in HCCs with *CTNNB1* mutations, revealing a downregulation of these NKG2D ligands by β-catenin activation.

Expression of the NKG2D receptor and *ULBP1* is associated with the presence of inflammatory cells in HCC

Given that NKG2D ligands were upregulated in aggressive inflamed HCCs and that *ULBP1/2* was downregulated in *CTNNB1*-

mutated HCC with low levels of inflammation, we investigated whether there was a relationship between the NKG2D system and inflammatory status in humans, as recently reported in mice.⁵³ We monitored the expression of *KLRK1* (NKG2D receptor) in our cohort of patients with HCC. We found that *KLRK1* was more strongly expressed in HCC samples displaying lymphocytic inflammation (Fig. 6A). Moreover, using MCP counter analysis to determine the nature of inflammatory infiltrates within the tumour microenvironment, we found a strong association between *KLRK1* expression and endothelial cell and immune population signatures (B cells, T cells, cytotoxic cells, myeloid dendritic cells, neutrophils and NK cells). We also found a weak association between *ULBP1* expression and these immune populations, except for NK cells.

Thus, the expression of both the ligands and receptor of NKG2D is associated with immune cell signatures in liver tumours, consistent with the notion that the NKG2D system is intrinsically coupled to inflammation in HCC.⁵³

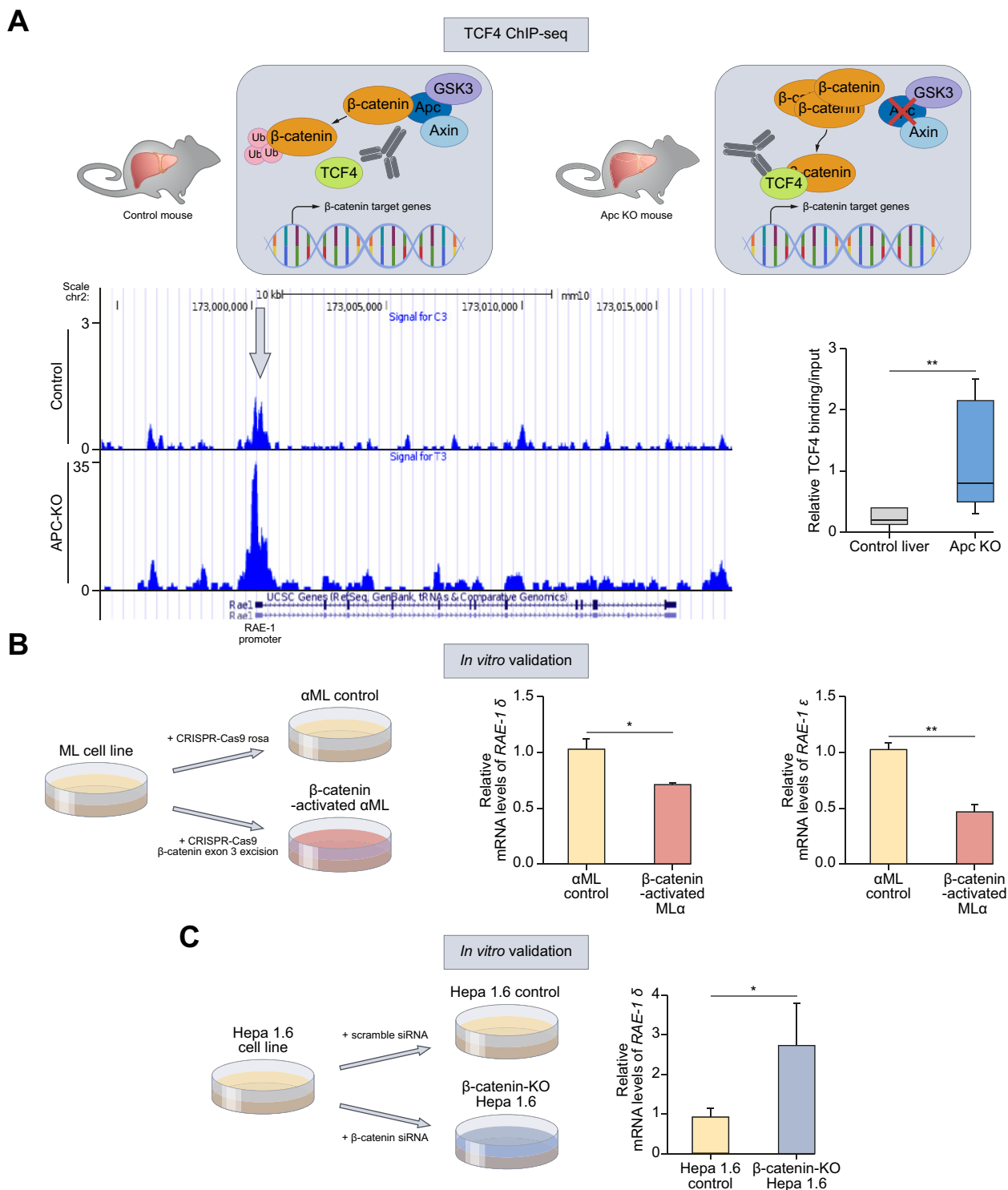


Fig. 5. The expression of the Rae-1 δ and Rae-1 ϵ NKG2D ligand genes is directly inhibited by β -catenin signalling. (A) Genomic environment of the *Rae-1* gene (UCSC Genome Browser) and ChIP-seq peaks at the *Rae-1* promoter. The crude reads for the ChIP-seq analysis of *Apc* ^{Δ Hep} and control livers against TCF4 (data deposited under accession number GSE32513 in the Gene Expression Omnibus database). qPCR was performed to amplify the *Rae-1* promoter. The data are expressed as the mean \pm SEM, with significance assessed in Mann-Whitney tests: ***p* < 0.01. (B) The levels of mRNA for NKG2D ligands (*Rae-1* δ and ϵ) were assessed by real-time RT-qPCR in CRISPR-Cas9 exon 3 β -catenin-activated α ML cells and CRISPR-Cas9 *rosa* control α ML cells. Gene expression was normalised against 18s rRNA for each sample. The data are expressed as the mean \pm SEM, with significance assessed in Mann-Whitney tests: **p* < 0.05; ***p* < 0.01. ChIP, chromatin immunoprecipitation; HCC, hepatocellular carcinoma; RT-qPCR, quantitative reverse-transcription PCR. (This figure appears in color on the web.)

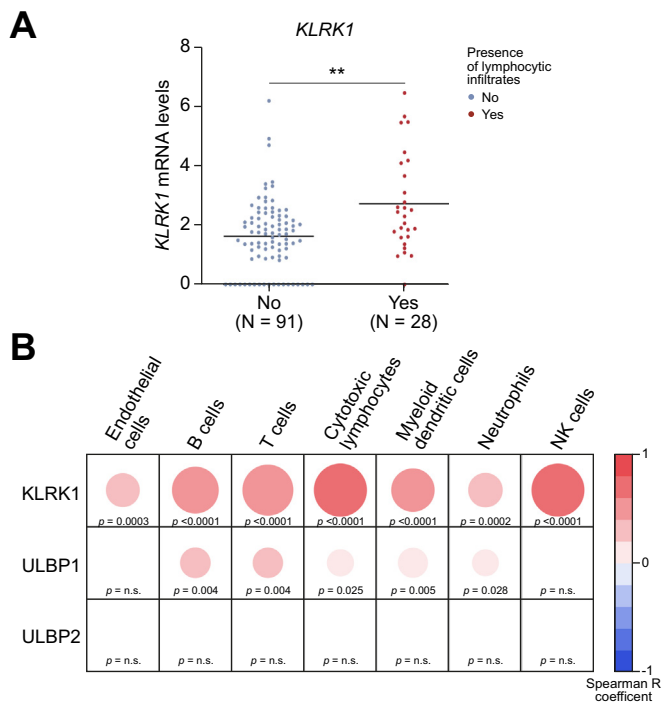


Fig. 6. Expression of the NKG2D receptor and ULBP1 is associated with the presence of inflammatory cells in HCC. (A) The levels of mRNA for *KLRK1* were assessed in HCC tumours with (Yes; n = 28) and without (No; n = 91) lymphocytic infiltrates. The fold-change (\log_2) in gene expression is presented relative to the level of expression in normal liver. The black lines correspond to the mean values. The significance of differences in expression was assessed with Mann-Whitney tests: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. (B) Correlation plot showing Spearman's rank correlations between the expression levels of *KLRK1*, *ULBP1*, *ULBP2* and those of the endothelial, B-cell, T-cell, cytotoxic cell, myeloid dendritic cell, neutrophil and NK cell signatures found in RT-qPCR data for HCC samples. Red circles indicate significant positive correlations. Blue circles indicate negative correlations. The intensity of the color indicates the magnitude of the rho correlation coefficient. ρ values are shown at the bottom of each cell. HCC, hepatocellular carcinoma; NK, natural killer; RT-qPCR, quantitative reverse-transcription PCR. (This figure appears in color on the web.)

Discussion

The worldwide incidence of HCC is similar to patient mortality, highlighting the poor prognosis of this cancer. Therapeutic options for HCC remain limited. Immunotherapy has yielded spectacular results for other solid tumours (breast, melanoma, prostate, lung), that were previously incurable.^{54–56} Immunotherapy strategies for HCC are currently being investigated, but the results have been poor.⁵⁷ Original ways of counteracting HCC progression are, therefore, urgently needed.

In this study, we investigated the expression of NKG2D ligands (human *MICA/B*, *ULBP1/2* and murine *Rae-1*) in both human and mice HCCs. These ligands are known to be involved in tumour immunosurveillance, and this work took the genomic features of liver tumours into account for the first time. Our work provides compelling evidence to suggest that the expression of NKG2D ligands is associated with aggressive liver tumorigenesis and that the level of expression of these ligands is lower in HCCs displaying chromosomal stability (G4/G5/G6) than in those displaying chromosomal instability (G1/G2/G3). We also found that *ULBP1/2* expression was specifically downregulated in HCCs with *CTNNB1* mutations relative to normal liver, and that the level of *ULBP1/2* expression was inversely correlated with the

level of expression of β -catenin target genes. We provide clear evidence, at the molecular level, in mouse models, for the downregulation of *Rae-1* ligands, the orthologs of *ULBPs*, by β -catenin. We found that expression of the NKG2D receptor and the *ULBP1* ligand was associated with the presence of immune cell signatures, suggesting an intricate link with the inflammation status of the HCC tumor.

We show here, for the first time, that the level of expression of *MICA/B* and *ULBP1/2* is higher in HCCs associated with a poor prognosis and early tumour recurrence (within 2 years of resection).^{50,58} NKG2D ligands can be shed into the bloodstream, and the presence of their soluble form in patient serum samples has been associated with poor prognosis for other cancers.⁵⁹ The levels of these ligands in the blood could therefore be used as a marker of disease progression for patients with HCC.

We show here that NKG2D ligands are more strongly expressed in group G1/G2/G3 HCCs. These HCCs are aggressive tumours with high levels of inflammation (hot tumours).^{6,38} Chronic inflammation in the liver creates a permissive environment favouring HCC development. Indeed, it underlies aggressiveness by enhancing cellular proliferation, angiogenesis and tumour invasiveness.⁶⁰ Inflammatory signals in the peritumoural tissue of patients with HCC have been shown to be associated with a poorer prognosis and tumour recurrence.^{61–64}

Using the DEN-induced HCC mouse model, Sheppard *et al.*,^{13,53} provided genetic evidence of a deleterious role of the NKG2D system, which has sustained tumour-promoting effects.⁵³ Indeed, they showed that the engagement of the NKG2D receptor by its cognate ligands increased the recruitment of inflammatory cells in the liver, increasing tumour aggressiveness.⁵³ Our data show that the expression of the NKG2D receptor and *ULBP1* is associated with the presence of inflammatory cells in human HCC tumours and with specific immune cell signatures corresponding to various populations, from lymphocytic to myeloid immune cells.

In our 2 mouse models of HCC, the proportion of NKG2D-expressing immune cells and the level of NKG2D expression were higher in HCCs with *Cttnb1* mutations than in DEN-induced HCCs. Based on these data, and given the almost total extinction of NKG2D ligand expression in HCCs with *Cttnb1* mutations, we propose that immune cells express higher levels of NKG2D receptors at their surface to facilitate the sensing of very small amounts of ligands.

We suggest that the activation of the NKG2D system contributes to a strong inflammatory response, exacerbating liver tissue damage and underlying HCC aggressiveness and poor patient outcome.

The immune response to NKG2D ligand expression should therefore be investigated further, to identify innovative targets for HCC treatment. HCCs with *CTNNB1* mutations are characterised by an absence of inflammatory infiltrates (cold tumours).^{10–12} Indeed, recent data for analyses of the immunological landscape of HCCs have highlighted the existence of a specific group of HCCs expressing markers of immune responses referred to as the “immune class” and excluding HCCs with *CTNNB1* mutations.¹⁰ However, the molecular basis of this lack of inflammation in tumours with *CTNNB1* mutations remains a matter of debate. Nevertheless, it has recently been shown that oncogenic β -catenin activation in melanoma tumours inhibits T-cell infiltration.⁶⁵ We suggest here that the low levels of NKG2D ligands in tumours with *CTNNB1* mutations and

the demonstration that β -catenin signalling partly inhibits NKG2D ligands may account for the less inflamed and less aggressive phenotype of these tumours.

Further studies are required to determine whether re-expressing Rae-1 ligands in *Cttnb1*-mutated mouse HCCs could convert these cold tumours into potentially aggressive hot HCCs.

Abbreviations

ChIP, chromatin immunoprecipitation; CTNNB1, catenin- β 1 gene; DEN, diethylnitrosamine; HCA, hepatocellular adenoma; HCC, hepatocellular carcinoma; KLRK1, killer cell lectin-like receptor subfamily K, member 1; KO, knockout; MICA/B, MHC class I polypeptide-related sequence A/B; NK, natural killer; NKG2D, natural killer group 2 D receptor; Rae-1, retinoic acid early 1; RT-PCR, reverse transcription PCR; TERT, telomerase reverse transcriptase; ULBP1, UL16 binding protein 1/2.

Financial support

This study was supported by grants from the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), Fondation Recherche Médicale (FRM) Equipe labellisée EQU201903007824, the Institut National du Cancer (PRTK-2017, PLBIO 2018-140), Fondation ARC (Association de Recherche sur le Cancer, PJA20171206232), Ligue Contre le Cancer (Comité de Paris, RS18/75-105), The Association Française pour l'Etude du Foie (AFEF-SUBV 2017), EVA-Plan Cancer INSERM HTE (CD16084DS) and the Agence Nationale de Recherche ANR (ANR-16-CE14). MC was a fellow of Université Paris Descartes (Université de Paris) and received a fellowship from Fondation ARC.

Conflict of interest

All authors agree to the submission of the manuscript and affirm that the material submitted for publication has not been reported before and is not under consideration for publication elsewhere. The authors have no conflicts of interest to disclose.

Please refer to the accompanying ICMJE disclosure forms for further details.

Authors' contributions

MC designed, performed and analysed the experiments, compiled the figures and wrote the manuscript. SC analysed the experiments, compiled the data and performed statistical analysis/designed the figures. AG designed and analysed the ChIP experiments, and compiled the data. MC, SC, AG, SF, SCM, CTN performed experimental research. AG, NG, JC, JZR, CD and JPC analysed the data and critically reviewed the manuscript. JZR and CD analysed the experiments, funded the project and critically reviewed the manuscript. JPC designed and performed the experiments, analysed the data, obtained funding for the project and wrote the manuscript.

Data availability statement

The sequencing data have been deposited in the EGA (European Genome-phenome Archive) database EGAS00001002879, EGAS00001001284 and EGAS00001003837.

Acknowledgements

We thank the Tumour Biobank of Henri Mondor University Hospital and the Réseau National Centre de Ressources Biologiques (CRB) Foie for contributing to the tissue collection. We

also thank the core facilities of the Cochin Institute (Histology, Immunostaining [HistIM], Animal Facility, and the CHIC (Center for Histology Imaging and Cytometry) facility of the Centre de Recherche des Cordeliers. We thank Nadia Boussetta for mouse breeding and genotyping. We also thank Dr. Saadé Kheir for critical reading of the manuscript, and Professor Isabelle Cremer and Dr. Jules Russick for their invaluable assistance with the immunostaining of immune cell populations on human HCC sections.

Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2021.01.017>.

References

- [1] Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Canc* 2015 Mar 1;136(5):E359–E386.
- [2] Llovet JM, Zucman-Rossi J, Pikarsky E, Sangro B, Schwartz M, Sherman M, et al. Hepatocellular carcinoma. *Nat Rev Primer* 2016 Apr 14;2:16018.
- [3] El-Serag HB. Hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med* 2011 Sep 22;365(12):1118–1127.
- [4] Forner A, Llovet JM, Bruix J. Hepatocellular carcinoma. *Lancet* 2012 Mar 31;379(9822):1245–1255.
- [5] Nault JC, Zucman-Rossi J. Genetics of hepatocellular carcinoma: the next generation. *J Hepatol* 2014 Jan;60(1):224–226.
- [6] Zucman-Rossi J, Villanueva A, Nault JC, Llovet JM. Genetic landscape and biomarkers of hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2015 Oct;149(5). 1226–1239 e4.
- [7] Nault JC, Ningarhari M, Rebouissou S, Zucman-Rossi J. The role of telomeres and telomerase in cirrhosis and liver cancer. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2019 Sep;16(9):544–558.
- [8] Llovet JM, Villanueva A, Lachenmayer A, Finn RS. Advances in targeted therapies for hepatocellular carcinoma in the genomic era. *Nat Rev Clin Oncol* 2015 Aug;12(8):436.
- [9] Zongyi Y, Xiaowu L. Immunotherapy for hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett*; 2019 Dec 4.
- [10] Sia D, Jiao Y, Martinez-Quetglas I, Kuchuk O, Villacorta-Martin C, Castro de Moura M, et al. Identification of an immune-specific class of hepatocellular carcinoma, based on molecular features. *Gastroenterology* 2017 Sep;153(3):812–826.
- [11] Ruiz de Galarreta M, Bresnahan E, Molina-Sanchez P, Lindblad KE, Maier B, Sia D, et al. Beta-catenin activation promotes immune escape and resistance to anti-PD-1 therapy in hepatocellular carcinoma. *Canc Discov* 2019 Aug;9(8):1124–1141.
- [12] Pinyol R, Sia D, Llovet JM. Immune exclusion-Wnt/CTNNB1 class predicts resistance to immunotherapies in HCC. *Clin Canc Res* 2019 Apr 1;25(7):2021–2023.
- [13] Sheppard S, Ferry A, Guedes J, Guerra N. The paradoxical role of NKG2D in cancer immunity. *Front Immunol* 2018;9:1808.
- [14] Bryceon YT, March ME, Ljunggren HG, Long EO. Synergy among receptors on resting NK cells for the activation of natural cytotoxicity and cytokine secretion. *Blood* 2006 Jan 1;107(1):159–166.
- [15] Bauer S, Groh V, Wu J, Steinle A, Phillips JH, Lanier LL, et al. Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science* 1999 Jul 30;285(5428):727–729.
- [16] Pende D, Cantoni C, Rivera P, Vitale M, Castriconi R, Marcenaro S, et al. Role of NKG2D in tumor cell lysis mediated by human NK cells: cooperation with natural cytotoxicity receptors and capability of recognizing tumors of nonepithelial origin. *Eur J Immunol* 2001 Apr;31(4):1076–1086.
- [17] Jamieson AM, Diefenbach A, McMahon CW, Xiong N, Carlyle JR, Raulet DH. The role of the NKG2D immunoreceptor in immune cell activation and natural killing. *Immunity* 2002 Jul;17(1):19–29.
- [18] Cerwenka A, Bakker AB, McClanahan T, Wagner J, Wu J, Phillips JH, et al. Retinoic acid early inducible genes define a ligand family for the activating NKG2D receptor in mice. *Immunity* 2000 Jun;12(6):721–727.
- [19] Diefenbach A, Jensen ER, Jamieson AM, Raulet DH. Rae1 and H60 ligands of the NKG2D receptor stimulate tumour immunity. *Nature* 2001 Sep 13;413(6852):165–171.
- [20] Cerwenka A, Baron JL, Lanier LL. Ectopic expression of retinoic acid early inducible-1 gene (RAE-1) permits natural killer cell-mediated rejection of

- a MHC class I-bearing tumor *in vivo*. Proc Natl Acad Sci USA 2001 Sep 25;98(20):11521–11526.
- [21] Gilfillan S, Ho EL, Cella M, Yokoyama WM, Colonna M. NKG2D recruits two distinct adapters to trigger NK cell activation and costimulation. Nat Immunol 2002 Dec;3(12):1150–1155.
- [22] Lanier LL. Up on the tightrope: natural killer cell activation and inhibition. Nat Immunol 2008 May;9(5):495–502.
- [23] Raulet DH, Gasser S, Gowen BG, Deng W, Jung H. Regulation of ligands for the NKG2D activating receptor. Annu Rev Immunol 2013;31:413–441.
- [24] Sutherland CL, Chalupny NJ, Cosman D. The UL16-binding proteins, a novel family of MHC class I-related ligands for NKG2D, activate natural killer cell functions. Immunol Rev 2001 Jun;181:185–192.
- [25] Salih HR, Antropius H, Gieseke F, Lutz SZ, Kanz L, Rammensee HG, et al. Functional expression and release of ligands for the activating immunoreceptor NKG2D in leukemia. Blood 2003 Aug 15;102(4):1389–1396.
- [26] Raffaghello L, Prigione I, Airoidi I, Camoriano M, Levreri I, Gambini C, et al. Downregulation and/or release of NKG2D ligands as immune evasion strategy of human neuroblastoma. Neoplasia 2004 Oct;6(5):558–568.
- [27] de Kruijff EM, Sajet A, van Nes JG, Putter H, Smit VT, Eagle RA, et al. NKG2D ligand tumor expression and association with clinical outcome in early breast cancer patients: an observational study. BMC Cancer 2012 Jan 18;12:24.
- [28] Chang YT, Wu CC, Shyr YM, Chen TC, Hwang TL, Yeh TS, et al. Secretome-based identification of ULBP2 as a novel serum marker for pancreatic cancer detection. PLoS One 2011;6(5):e20029.
- [29] Paschen A, Sucker A, Hill B, Moll I, Zapatka M, Nguyen XD, et al. Differential clinical significance of individual NKG2D ligands in melanoma: soluble ULBP2 as an indicator of poor prognosis superior to S100B. Clin Canc Res 2009 Aug 15;15(16):5208–5215.
- [30] Kamei R, Yoshimura K, Yoshino S, Inoue M, Asao T, Fuse M, et al. Expression levels of UL16 binding protein 1 and natural killer group 2 member D affect overall survival in patients with gastric cancer following gastrectomy. Oncol Lett 2018 Jan;15(1):747–754.
- [31] McGilvray RW, Eagle RA, Watson NF, Al-Attar A, Ball G, Jafferji I, et al. NKG2D ligand expression in human colorectal cancer reveals associations with prognosis and evidence for immunoeediting. Clin Canc Res 2009 Nov 15;15(22):6993–7002.
- [32] Cho H, Chung JY, Kim S, Braunschweig T, Kang TH, Kim J, et al. MICA/B and ULBP1 NKG2D ligands are independent predictors of good prognosis in cervical cancer. BMC Cancer 2014 Dec 15;14:957.
- [33] Xu Y, Zhou L, Zong J, Ye Y, Chen G, Chen Y, et al. Decreased expression of the NKG2D ligand ULBP4 may be an indicator of poor prognosis in patients with nasopharyngeal carcinoma. Oncotarget 2017 Jun 27;8(26):42007–42019.
- [34] Madjd Z, Spendlove I, Moss R, Bevin S, Pinder SE, Watson NF, et al. Upregulation of MICA on high-grade invasive operable breast carcinoma. Canc Immun 2007 Oct 22;7:17.
- [35] Chen Y, Lin G, Guo ZQ, Zhou ZF, He ZY, Ye YB. Effects of MICA expression on the prognosis of advanced non-small cell lung cancer and the efficacy of CIK therapy. PLoS One 2013;8(7):e69044.
- [36] McGilvray RW, Eagle RA, Rolland P, Jafferji I, Trowsdale J, Durrant LG. ULBP2 and RAET1E NKG2D ligands are independent predictors of poor prognosis in ovarian cancer patients. Int J Canc 2010 Sep 1;127(6):1412–1420.
- [37] Nault JC, Martin Y, Caruso S, Hirsch TZ, Bayard Q, Calderaro J, et al. Clinical impact of genomic diversity from early to advanced hepatocellular carcinoma. Hepatology 2019 Jun 17.
- [38] Boyault S, Rickman DS, de Reynies A, Balabaud C, Rebouissou S, Jeannot E, et al. Transcriptome classification of HCC is related to gene alterations and to new therapeutic targets. Hepatology 2007 Jan;45(1):42–52.
- [40] Bayard Q, Meunier L, Peneau C, Renault V, Shinde J, Nault JC, et al. Cyclin A2/E1 activation defines a hepatocellular carcinoma subclass with a rearrangement signature of replication stress. Nat Commun 2018 Dec 7;9(1):5235.
- [41] Hirsch TZ, Negulescu A, Gupta B, Caruso S, Noblet B, Couchy G, et al. BAP1 mutations define a homogeneous subgroup of hepatocellular carcinoma with fibrolamellar-like features and activated PKA. J Hepatol 2020 May;72(5):924–936.
- [42] Anson M, Crain-Denoyelle AM, Baud V, Chereau F, Gougelet A, Terris B, et al. Oncogenic beta-catenin triggers an inflammatory response that determines the aggressiveness of hepatocellular carcinoma in mice. J Clin Invest 2012 Feb;122(2):586–599.
- [43] de La Coste A, Romagnolo B, Billuart P, Renard CA, Buendia MA, Soubrane O, et al. Somatic mutations of the beta-catenin gene are frequent in mouse and human hepatocellular carcinomas. Proc Natl Acad Sci USA 1998 Jul 21;95(15):8847–8851.
- [44] Qi Y, Chen X, Chan CY, Li D, Yuan C, Yu F, et al. Two-dimensional differential gel electrophoresis/analysis of diethylnitrosamine induced rat hepatocellular carcinoma. Int J Canc 2008 Jun 15;122(12):2682–2688.
- [45] Colnot S, Decaens T, Niwa-Kawakita M, Godard C, Hamard G, Kahn A, et al. Liver-targeted disruption of Apc in mice activates beta-catenin signaling and leads to hepatocellular carcinomas. Proc Natl Acad Sci USA 2004 Dec 7;101(49):17216–17221.
- [46] Benhamouche S, Decaens T, Godard C, Chambrey R, Rickman DS, Moinard C, et al. Apc tumor suppressor gene is the “zonation-keeper” of mouse liver. Dev Cell 2006 Jun;10(6):759–770.
- [47] L’Hermitte A, Pham S, Cadoux M, Couchy G, Caruso S, Anson M, et al. Lect2 controls inflammatory monocytes to constrain the growth and progression of hepatocellular carcinoma. Hepatology 2019 Jan;69(1):160–178.
- [48] Nelson JD, Denisenko O, Bomsztyk K. Protocol for the fast chromatin immunoprecipitation (ChIP) method. Nat Protoc 2006;1(1):179–185.
- [49] Hoguelet A, Torre C, Veber P, Sartor C, Bachelot L, Denechaud PD, et al. T-cell factor 4 and beta-catenin chromatin occupancies pattern zonal liver metabolism in mice. Hepatology 2014 Jun;59(6):2344–2357.
- [50] Nault JC, De Reynies A, Villanueva A, Calderaro J, Rebouissou S, Couchy G, et al. A hepatocellular carcinoma 5-gene score associated with survival of patients after liver resection. Gastroenterology 2013 Jul;145(1):176–187.
- [51] Calderaro J, Couchy G, Imbeaud S, Amaddeo G, Letouze E, Blanc JF, et al. Histological subtypes of hepatocellular carcinoma are related to gene mutations and molecular tumour classification. J Hepatol 2017 Oct;67(4):727–738.
- [52] Nault JC, Calderaro J, Di Tommaso L, Balabaud C, Zafrani ES, Bioulac-Sage P, et al. Telomerase reverse transcriptase promoter mutation is an early somatic genetic alteration in the transformation of premalignant nodules in hepatocellular carcinoma on cirrhosis. Hepatology 2014 Dec;60(6):1983–1992.
- [53] Sheppard S, Guedes J, Mroz A, Zavitsanou A-M, Kudo H, Rothery SM, et al. The immunoreceptor NKG2D promotes tumour growth in a model of hepatocellular carcinoma. Nat Commun 2017;27(8):13930.
- [54] Hodi FS, O’Day SJ, McDermott DF, Weber RW, Sosman JA, Haanen JB, et al. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. N Engl J Med 2010 Aug 19;363(8):711–723.
- [55] Zou W, Wolchok JD, Chen L. PD-L1 (B7-H1) and PD-1 pathway blockade for cancer therapy: mechanisms, response biomarkers, and combinations. Sci Transl Med 2016 Mar 2;8(328): 328rv4.
- [56] Brahmer JR, Tykodi SS, Chow LQ, Hwu WJ, Topalian SL, Hwu P, et al. Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer. N Engl J Med 2012 Jun 28;366(26):2455–2465.
- [57] Nishida N, Kudo M. Immune phenotype and immune checkpoint inhibitors for the treatment of human hepatocellular carcinoma. Canc Basel 2020 May 18;12(5).
- [58] Sherman M. Recurrence of hepatocellular carcinoma. N Engl J Med 2008 Nov 6;359(19):2045–2047.
- [59] Dhar P, Wu JD. NKG2D and its ligands in cancer. Curr Opin Immunol 2018 Apr;51:55–61.
- [60] Hou J, Zhang H, Sun B, Karin M. The immunobiology of hepatocellular carcinoma in humans and mice: basic concepts and therapeutic implications. J Hepatol 2020 Jan;72(1):167–182.
- [61] Budhu A, Forgues M, Ye QH, Jia HL, He P, Zanetti KA, et al. Prediction of venous metastases, recurrence, and prognosis in hepatocellular carcinoma based on a unique immune response signature of the liver micro-environment. Canc Cell 2006 Aug;10(2):99–111.
- [62] Hoshida Y, Villanueva A, Kobayashi M, Peix J, Chiang DY, Camargo A, et al. Gene expression in fixed tissues and outcome in hepatocellular carcinoma. N Engl J Med 2008 Nov 6;359(19):1995–2004.
- [63] Sia D, Llovet JM. Liver cancer: translating “-omics” results into precision medicine for hepatocellular carcinoma. Nat Rev Gastroenterol Hepatol 2017 Oct;14(10):571–572.
- [64] Sia D, Villanueva A, Friedman SL, Llovet JM. Liver Cancer cell of origin, molecular class, and effects on patient prognosis. Gastroenterology 2017 Mar;152(4):745–761.
- [65] Spranger S, Bao R, Gajewski TF. Melanoma-intrinsic beta-catenin signalling prevents anti-tumour immunity. Nature 2015 Jul 9;523(7559): 231–235.