



HAL
open science

Rôle de la O-GlcNAc transférase (OGT) dans la physiopathologie hépatique

Lucia Parlati

► **To cite this version:**

Lucia Parlati. Rôle de la O-GlcNAc transférase (OGT) dans la physiopathologie hépatique. Biologie cellulaire. Université Paris Cité, 2023. Français. NNT : 2023UNIP5106 . tel-04903775

HAL Id: tel-04903775

<https://theses.hal.science/tel-04903775v1>

Submitted on 21 Jan 2025

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 Bio Sorbonne Paris Cité 562
Institut Cochin (INSERM U1016 / CNRS UMR8104)

Rôle de la O-GlcNAc transférase (OGT) dans la physiopathologie hépatique

Lucia PARLATI

Thèse de doctorat de Biologie Cellulaire et Moléculaire

Dirigée par le **Dr Catherine POSTIC**

Présentée et soutenue publiquement le 29 Septembre 2023

Devant un jury composé de :

Beatrice BAILLY-MAITRE
CR-HDR, Université Cote D'azur

Rapporteuse

Tony LEFEBVRE
PUPH Université de Lille

Rapporteur

Hélène GILGENKRANTZ
DR, Université Paris Cité

Examinatrice

Sara LEMOINNE
MCU-PH, Université Paris Cité

Examinatrice

Gabriel PERLEMUTER
PUPH, Université Paris Saclay

Examineur

Catherine POSTIC
DR, Université Paris Cité

Directrice de thèse

Tarik ISSAD
DR, Université Paris Cité

Membre invité du jury

*Alla mia famiglia, mio porto sicuro
Alla voglia di sapere, che sia sempre mia fedele compagna*

Titre : Rôle de la O-GlcNAc transférase (OGT) dans la physiopathologie hépatique

Résumé : La O-GlcNAcylation est une modification post-traductionnelle dynamique et réversible contrôlée par l'activité de deux enzymes, la O-GlcNAc transférase (OGT) et la O-GlcNAcase (OGA). Ces deux enzymes interviennent dans le cycle dynamique de la O-GlcNAcylation sur une grande variété de protéines cytosoliques, nucléaires et mitochondriales d'une manière sensible aux nutriments et au stress (Zhang et al., 2019). En conséquence, il a été proposé que la O-GlcNAcylation fonctionne comme un capteur de nutriments et de stress régulant les processus cellulaires allant de la transcription et de la traduction à la transduction du signal et au métabolisme. La perturbation de l'homéostasie de la O-GlcNAcylation est impliquée dans la physiopathologie de plusieurs maladies, notamment le cancer, le diabète ou la neurodégénérescence (Nie et Yi, 2019). Notre laboratoire a précédemment rapporté que la O-GlcNAcylation d'effecteurs clés du métabolisme contribue de manière significative à la gluco-lipototoxicité dans le foie (Guinez et al., 2011 ; Kuo et al., 2008) et dans les cellules β pancréatiques (Fardini et al., 2014 ; Filhoulaud et al., 2019).

Le premier objectif de ma thèse a été de déterminer plus précisément les conséquences d'une inactivation génique ciblée de l'enzyme OGT dans les hépatocytes *in vivo* et d'explorer l'effet d'un changement nutritionnel sur le phénotype hépatique. En utilisant des souris avec une inactivation génique ciblée de l'OGT dans les hépatocytes (OGT^{LKO}), notre étude révèle que l'OGT est essentielle à l'homéostasie du foie. En effet, l'analyse de souris OGT^{LKO} âgées de 4 semaines ont révélé un stress oxydant et un stress du RE importants, des dommages à l'ADN, ainsi qu'une inflammation et une fibrose hépatique. La sensibilité à l'apoptose induite par le stress oxydant et le stress du RE était également augmentée dans les hépatocytes OGT^{LKO}. Alors que l'expression de l'OGT a été partiellement restaurée dans le foie de souris OGT^{LKO} âgées de 8 semaines, les lésions hépatiques et la fibrose se sont aggravées avec le temps. Fait intéressant, le sevrage des souris OGT^{LKO} avec un régime cétogène a totalement prévenu les altérations hépatiques des souris OGT^{LKO}, indiquant qu'un apport réduit en glucides protège le foie déficient en OGT.

Le second objectif de mon travail de thèse a été de caractériser un modèle murin original présentant une délétion inductible de l'OGT hépatocytaire (OGT^{INDLKO}), afin de

s'affranchir des facteurs confondants associés au développement post-natal. En effet, La caractérisation de ce modèle nous a permis de démontrer que le rôle de l'OGT dans le maintien de l'homéostasie hépatique est indépendant de l'âge des souris. En fait, les souris OGT^{INDLKO} âgées de 4 et 8 semaines ont le même phénotype hépatique que les souris OGT^{LKO} du même âge, avec un stress oxydant et un stress du RE important, une inflammation et une fibrose hépatique sous régime standard.

Enfin, afin de transposer nos études chez l'homme (troisième objectif de ma thèse), nous avons analysé les niveaux d'expression de l'OGT et de la O-GlcNAcylation hépatiques dans le foie d'une population de patients ayant subi une chirurgie bariatrique pour une obésité morbide (Cohorte Abos-CHU de Lille). Nous avons complété ces informations par une analyse informatique des données obtenues du foie de patients (hommes et femmes) ayant une MASLD histologiquement prouvée (Cohorte CHU de Toulouse). L'analyse de l'expression de l'OGT dans la cohorte Abos a révélé que l'expression de l'OGT et les niveaux de la O-GlcNAcylation hépatiques sont augmentés chez les patients atteints de stéatose et de MASH. De plus, nous avons identifié un dimorphisme sexuel du réseau de gènes dont l'expression hépatique est corrélée à celle de l'*Ogt*.

Ces résultats identifient l'OGT comme un médiateur clé de l'homéostasie et de la survie des hépatocytes et valident les souris OGT^{LKO} et OGT^{INDLKO} comme des modèles précieux pour évaluer les traitements contre la fibrose hépatique. Le rôle de l'OGT dans la physiopathologie de la MASLD devrait être exploré d'avantage afin d'identifier des cibles thérapeutiques potentielles.

Mots clés : OGT, stress oxydant, fibrose hépatique, apport glucidique, régime cétogène, MASLD, MASH

Title: Role of O-GlcNAc transferase (OGT) in liver physiopathology

Abstract: O-GlcNAcylation is a dynamic and reversible post-translational modification controlled by the activity of two enzymes, O-GlcNAc transferase (OGT) and O-GlcNAcase (OGA). These two enzymes mediate the dynamic cycle of O-GlcNAcylation on a wide variety of cytosolic, nuclear and mitochondrial proteins in a nutrient and stress sensitive manner (Zhang et al., 2019).

Accordingly, O-GlcNAcylation has been proposed to function as a nutrient and stress sensor regulating cellular processes ranging from transcription and translation to signal transduction and metabolism. Disruption of O-GlcNAcylation homeostasis has been implicated in the pathophysiology of several diseases, including cancer, diabetes and neurodegeneration (Nie and Yi, 2019). Our laboratory has previously reported that O-GlcNAcylation is a key metabolic effector, contributing significantly to gluco-lipototoxicity in the liver (Guinez et al., 2011; Kuo et al., 2008) and in β pancreatic cells (Fardini et al., 2014; Filhoulaud et al., 2019).

In this context, the first objective of my PhD was to determine more precisely the consequences of a selective deletion of the OGT in hepatocytes *in vivo* and to explore the effect of a nutritional change on the hepatic phenotype. Using mice with constitutive and targeted deletion of OGT in hepatocytes (OGT^{LKO}), our study suggests that OGT is essential for liver homeostasis. Indeed, analysis of 4-week-old OGT^{LKO} mice revealed significant oxidative and ER stress, DNA damage, as well as liver inflammation and fibrosis. Susceptibility to oxidative and ER stress-induced apoptosis was also increased in OGT^{LKO} hepatocytes. While OGT expression was partially recovered in the liver of 8-week-old OGT^{LKO} mice, liver damage and fibrosis worsened over time. Interestingly, weaning OGT^{LKO} mice on a ketogenic diet completely prevented liver damage in OGT^{LKO} mice, indicating that reduced carbohydrate intake protects the OGT-deficient liver.

In order to elucidate the consequences of hepatocyte OGT deletion independently of any confounding factors associated with postnatal development, we developed a model with hepatocyte OGT deletion in adulthood. Indeed, the second objective of my PhD work was to characterize an original mouse model presenting an inducible deletion of the hepatocyte OGT (OGT^{INDLKO}). We demonstrated that the role of OGT in

the maintenance of hepatic homeostasis is independent of the age of the mice. In fact, 4- and 8-week-old OGT^{INDLKO} mice have the same hepatic phenotype as OGT^{LKO} mice at the same age, with significant oxidative and ER stress, inflammation, and liver fibrosis on the standard diet.

Finally, in order to transpose our studies to humans (third objective of my PhD), we analyzed the expression levels of hepatic OGT and O-GlcNAcylation in the liver of patients who underwent bariatric surgery for morbid obesity (Abos-CHU Lille cohort). We supplemented this information with an analysis of data obtained from the liver of patients (men and women) with histologically proven MASLD (Toulouse University Hospital Cohort). The analysis of OGT expression in the Abos cohort revealed that OGT expression and hepatic O-GlcNAcylation levels are increased in patients with steatosis and MASH. Moreover, we identified a sexual dimorphism of the gene network whose hepatic expression is correlated with that of *Ogt*.

These results identify OGT as a key mediator of hepatocyte homeostasis and survival and validate OGT^{LKO} and OGT^{INDLKO} mice as a valuable model for evaluating treatments for liver fibrosis.

The role of OGT in the pathophysiology of MASLD should be further explored to identify potential therapeutic targets.

Key words: OGT, oxidative stress, liver fibrosis, carbohydrate intake, ketogenic diet, MASLD, MASH

Remerciements

Il me sera très difficile de remercier tout le monde, car c'est grâce à l'aide de nombreuses personnes que j'ai pu mener cette thèse à son terme.

Je remercie Dr. Béatrice Bailly Maitre et Pr. Tony Lefebvre qui m'ont fait l'honneur d'être rapporteurs de ma thèse, ils ont pris le temps de relire et évaluer mon travail. Leurs remarques m'ont permis d'améliorer ma thèse. Pour tout cela je les remercie.

Je remercie Pr. Gabriel Perlemuter, Dr. Hélène Gilgenkrantz et Dr. Sara Lemoine d'avoir accepté de participer à mon jury de thèse, je suis certaine que la discussion avec eux le jour de la soutenance sera une contribution scientifique remarquable à notre projet de recherche

Je tiens à remercier Catherine pour toute son aide. Ses compétences et sa bienveillance m'ont accompagnées tout au long de ce parcours du doctorat. Je suis ravie d'avoir travaillé en sa compagnie car outre son appui scientifique, elle a été toujours là pour me soutenir personnellement et professionnellement et me conseiller au cours de l'élaboration de cette thèse. J'espère pouvoir continuer à travailler avec elle pour m'enrichir toujours plus de notre collaboration.

Je remercie infiniment toute l'Équipe Postic-Issad présente et passée (Fadila, Marion, Paula, Thaïs, Michèle, Sandra, Florian, Mélanie, Delphine, Dalale, Wafa, Patrick, Abdel, Zhihao) : ils m'ont accompagnée dès les premiers pas dans ce parcours et je les remercie. Le fait de pouvoir compter sur leur aide au quotidien et pendant mes manip était fondamental pour moi. Les échanges scientifiques et extra-scientifiques avec eux m'ont beaucoup appris.

Je remercie Tarik pour toutes nos discussions très enrichissantes, pour son aide à la rédaction du manuscrit de thèse et pour ses conseils qui m'ont accompagnée tout au long de mon cursus.

Je remercie Maryline, Rachel et Fabiola de la plateforme HISTIM ; leurs belles images ont été le pivot de cette thèse et de notre publication.

Je remercie l'INSERM (Poste d'Accueil) et l'AFEF (Société Française d'Hépatologie) qui ont financé mon doctorat.

Je remercie mes collègues du Service d'Hépatologie de l'Hôpital Cochin (Pr. Stanislas Pol, Pr. Vincent Mallet, Pr. Philippe Sogni, Dr. Clémence Hollande, Dr. Anne Laurain, Dr. Hélène Fontaine, Dr. Anais Vallet-Pichard, Dr. Marion Corouge, Dr. Valerie Dhalluin) qui m'ont soutenue dans mon parcours professionnel.

Ringrazio tutta la mia famiglia (mamma, papà, Luca, Carlo, Sara, Ilenia, Riccardo, Ludovica, Diego e Camilla), anche se siamo lontani, il loro supporto é per me fondamentale, non avrei la stessa forza e ambizione senza di loro.

Ringrazio mio figlio Francesco che da otto mesi ha riempito, stravolto, completato la mia vita. Ha partecipato, quando era nel mio grembo, a una parte degli esperimenti di questo dottorato e nei primi mesi di vita alla stesura del manoscritto della tesi. Lo ringrazio perché da quando c'è lui, la mia vita é piu bella.

Infine ringrazio mio marito Edoardo che da quando ci conosciamo mi supporta e sopporta. So che posso contare sempre su di lui, anche quando le nostre idee sembrano divergere. Senza di lui, finalizzare questo progetto professionale nei tempi sarebbe stato ben piu arduo. Lo ringrazio perché c'è nella mia vita.

Enfin je tiens à remercier toutes les personnes qui, au cours de ces trois années m'ont donné un sourire, partagé avec moi une expérience, coloré une journée : le simple fait d'avoir croisé mon chemin les place ici, parmi les personnes que je tiens à remercier.

Liste des publications

Publications pendant les années de thèse

1. Treatment of hepatitis C virus infection. **Parlati L**, Hollande C, Pol S. Clin Res Hepatol Gastroenterol. 2021 Jul;45(4):101578.
2. New targets for NAFLD. **Parlati L**, Régnier M, Guillou H, Postic C. JHEP Rep. 2021 Aug 8;3(6):100346.
3. Burden of liver disease progression in hospitalized patients with type 2 diabetes mellitus. Mallet V, **Parlati L**, Martinino A, Scarano Pereira JP, Navas Jimenez C, Sakka M, Bouam S, Retbi A, Krasteva D, Meritet JF, Schwarzingger M, Thabut D, Rufat P, Bonnefont-Rousselot D, Sogni P, Pol S, Tsochatzis E; Demosthenes research group. J Hepatol. 2021 Oct 1:S0168-8278(21)02092-4.
4. Physiopathologie de la NASH. **Parlati L.**, Postic. C. n°243 du Bulletin de l'Association des Anciens Elèves de l'Institut Pasteur (AAEIP) 2022.
5. L'index FIB-4 : un biomarqueur simple pour dépister la fibrose hépatique. **L.Parlati**, V. Mallet. Revue de Biologie Médicale/N°368- Septembre- Octobre 2022.
6. Les complications hépatiques de l'immunothérapie des cancers. **L.Parlati**, V. Mallet, S. Pol, P.Sogni. La Lettre de l'Hépatogastroentérologue / N° 3 / juin 2022.
7. Physiopathologie de la stéatose hépatique non-alcoolique (NAFLD). **Parlati L**, Régnier M, Guillou H, Postic C. Médecine des maladies métaboliques, Vol.17 N°3, 222-227, Doi : 10.1016/j.mmm.2023.03.005.
8. New insights into the inter-organ crosstalk mediated by ChREBP. Carbinatti T, Régnier M, **Parlati L**, Benhamed F, Postic C. Front Endocrinol (Lausanne). 2023 Feb 27;14:1095440. doi: 10.3389/fendo.2023.1095440.
9. The role of ChREBP in carbohydrate sensing and NAFLD development. Régnier M, Carbinatti T, **Parlati L**, Benhamed F, Postic C. Nat Rev Endocrinol. 2023 Jun;19(6):336-349. doi: 10.1038/s41574-023-00809-4.
10. Histological Characteristics and Management of Hepatitis on Immune Checkpoint Inhibitors: A Retrospective Descriptive Study. **Parlati L**, Marcin K,

Terris B, Vallet-Pichard A, Corouge M, Hollande C, Sogni P, Mallet V, Pol S. J Clin Med. 2023 May 29;12(11):3751. doi: 10.3390/jcm12113751.

11. Ortega-Prieto P*, **Parlati L***, Benhamed F, Regnier M et al. OGT acts a critical nutritional node for the control of liver homeostasis. JHep Report (August 12, 2023, DOI:<https://doi.org/10.1016/j.jhepr.2023.100878> ,*co-premier auteurs).
12. Risk of Grade 3 or 4 Liver Injury Associated with Immune Checkpoint Inhibitors: a multicenter study. **Lucia Parlati**, Mehdi Sakka, Aurelia Retbi, Samir Bouam, Lamia Hassani, Jean- François Meritet, Pierre Rufat, Dominique Bonnefont-Rousselot, Rui Batista, Benoit Terris, Agnès Bellanger, Dominique Thabut, Aurore Vozy, Jean- Philippe Spano, François Goldwasser, Selim Aractingi, Philippe Sogni, Stanislas Pol, Vincent Mallet, for the CERTIM and DEMOSTHENES research groups. JHep Report (August 11, 2023, DOI:<https://doi.org/10.1016/j.jhepr.2023.100880>)
13. The contribution of alcohol use disorders to the burden of hepatocellular cancer in patients with type-2 diabetes mellitus: a 2011-2020 national cohort study. **Lucia Parlati**, Stylianos Tzedakis, Samir Bouam, Simplicie Donfack, Edouard Audit, Philippe Sogni, Stanislas Pol, Emmanuel Tsochatzis, Michaël Schwarzingler, Jürgen Rehm, Vincent Mallet, for the Demosthenes research group. (En soumission).

Liste des communications aux congrès

Communications orales pendant les années de thèse

1. Un régime pauvre en glucides prévient partiellement le phénotype hépatique des souris avec une délétion sélective de l'OGT hépatique. L.Parlati, P.Ortega-Prieto, F.Benhamed, M. Montabord, T. Issad, C. Postic. (CO, AFEF, Biarritz 29 Septembre – 2 Octobre 2021).
2. Burden of hepatocellular cancer in patients with type-2 diabetes mellitus: a 2011–2020, french, longitudinal, retrospective, national, cohort study. Lucia Parlati, Samir Bouam, Michael Schwarzingger, Emmanuel Tsochatzis, Philippe Sogni, Stanislas Pol, Vincent Mallet. (CO, Journal of Hepatology 2022 vol. 77(S1) | S1–S118).
3. Risques de carcinome hépatocellulaire chez les patients avec un trouble de l'usage de l'alcool : étude nationale pour 2012-2021. Parlati L, Bouam S, Schwarzingger M, Fontaine H, Vallet- Pichard A, Corouge M, Lair-Mehiri L, Sogni P. Ganne Carrie N, Pol S, Mallet V. (CO, AFEF, Dijon, 5-7 Octobre 2022).
4. Risques de carcinome hépatocellulaire chez les patients avec un diabète de type 2: étude nationale française pour 2011-2020. Parlati L, Bouam S, Schwarzingger M, Fontaine H, Vallet- Pichard A, Corouge M, Lair-Mehiri L, Sogni P. Ganne Carrie N, Pol S, Mallet V. (CO, AFEF, Dijon, 5-7 Octobre 2022).
5. Délétion de l'OGT hépatocytaire à l'âge adulte : un modèle inductible et spontané de fibrose hépatique avancée. Parlati L, Benhamed F, Regnier M, Ortega Prieto P, Issad T, Postic C. (CO, AFEF, Dijon, 5-7 Octobre 2022).
6. Hepatocyte OGT deletion in adulthood: an inducible and spontaneous model of advanced liver fibrosis. Parlati L, Benhamed F, Regnier M, Ortega Prieto P, Issad T, Postic C. (CO, AASLD, Washington 3-8 Novembre 2022).
7. Histoire naturelle de l'infection AgHBe négative dans la cohorte Française ANRS CO22 HEPATHER. L. Parlati, L. Alric, F. Zoulim, J. Boursier, T. Asselah, S. Pol, V. De Ledinghen, M. Bourlière, D. Thabut, X. Causse, N. Ganne, C. Jézéquel, F. Habersetzer, JP. Bronowicki, C. Lusivika Nzinga, C. Dorival. (CO, AFEF, Rennes 4-6 Octobre 2023)

8. Infection chronique au VHB : impact de la coinfection VHD et du traitement avec interféron sur la mortalité et les complications hépatiques dans la cohorte Française, multicentrique, prospective et observationnelle de l'ANRS CO22 HEPATHER. L. Parlati, GP. Pageaux, S. Métivier, T. Decaens, G. Riachi, V. Leroy, V. Ozenne, JC. Duclos Vallée, I. Rosa, V. Loustaud-Ratti, P. Mathurin, J. Gournay, M. Gelu-Simeon, J. Bellet, J. Nicol, F. Carrat. (CO, AFEF, Rennes 4-6 Octobre 2023)
9. Traitement hospitalier des troubles de l'usage de l'alcool après hépatite alcoolique aiguë sévère: étude rétrospective Nationale de survie entre 2012 et 2021. L. Parlati*, C. Mouliade, S. Bouam, M. Corouge, D. Karinthe, A. Vallet-Pichard, V. D'Halluin Venier, A. Benyamina, A. Louvet, E. Nguyen Khac, S. Pol, P. Sogni, V. Mallet. (CO, AFEF, Rennes 4-6 Octobre 2023)

Communications affichées pendant les années de thèse

1. A low carbohydrate diet partially prevents the hepatic histological damage of hepatocyte OGT- deficient mice. L.Parlati., P. Ortega-Prieto, F. Benhamed, M. Montabard, T. Issad, C. Postic. Journal of Hepatology 2021, CA1027, Digital ILC Juin 2021. CA (ePoster oral communication).
2. Prognosis of severe HBV reactivation in western countries: role of MELD score. E.Poli, I.Ruiz, L.Meunier, J. Dumortier, L.Parlati, P. Carrier, N. Carbonnel, B. Buchard, C.Vinaixa, I.Kounis, L.Duhaut, R.Sobesky, E. de Martin, B. Roche, P.Ichai, A.Roque Afonso D.Samuel. A. Coily. Journal of Hepatology 2021, CA813, Digital ILC Juin 2021.
3. A low carbohydrate diet partially prevents the hepatic phenotype of hepatocyte OGT-deficient mice. L.Parlati., P. Ortega-Prieto, F. Benhamed, M. Montabard, T. Issad, C. Postic. Hepatology 2021, CA1755, Digital AASLD Novembre 2021. CA (ePoster).
4. Réactivation sévère du VHB dans les pays occidentaux role du score MELD dans le pronostic de survie sans transplantation. E.Poli, I.Ruiz, L.Meunier, J. Dumortier, L.Parlati, P. Carrier, N. Carbonnel, B. Buchard, C.Vinaixa, I.Kounis, L.Duhaut, R.Sobesky, E. de Martin, B. Roche, P.Ichai, A.Roque Afonso D.Samuel. A. Coily. (CO, AFEF, Biarritz 29 Septembre – 2 Octobre 2021).

5. Dépistage de l'infection virale C et accès au traitement en vie réelle hospitalière. L. Parlati, A. Vallet-Pichard, J.F. Meritet, C. Guérin, H. Fontaine, P. Sogni, V. Mallet, S. Pol. (CA, AFEF, Biarritz 29 Septembre – 2 Octobre 2021).
6. Role of liver biopsy in management of immune checkpoint inhibitors hepatitis: a single-center retrospective study. Kennie Marcin, Lucia Parlati, Benoit Terris, Clemence Hollande, Anais Vallet Pichard, Helene Fontaine, Marion Cororuge, Loriane Lair Mehiri, Vincent Mallet, Philippe Sogni, Stanislas Pol. (CA, Journal of hepatology 2022 vol. 77(S1) | S389–S664).
7. Liver toxicities of immune checkpoints inhibitors for cancer: a multicenter retrospective study. Lucia Parlati, Mehdi Sakka, Agnès Bellanger, Jean François Meritet, Samir Bouam, Aurelia Retbi, Pierre Rufat, Dominique Bonnefont-Rousselot, Rui Batista, Patrick Tilleul, Dominique Thabut, Jean-Philippe Spano, Francois Goldwasser, Philippe Sogni, Stanislas Pol, Vincent Mallet. (CA, Journal of Hepatology 2022 vol. 77(S1) | S389–S664).
8. Risk of hepatocellular cancer in patients with alcohol use disorders in France: A 2012-2021 National Cohort study. Parlati L, Bouam S, Schwarzing M, Fontaine H, Vallet-Pichard A, Corouge M, Lair-Mehiri L, Sogni P. Ganne Carrie N, Pol S, Mallet V. (CA, AASLD, Washington 3-8 Novembre 2022).
9. Délétion de la O-GlcNAc transférase (OGT) dans les hépatocytes : un modèle spontané de fibrose hépatique avancée associée à une réduction de l'activité du récepteur nucléaire FXR. L. Parlati*, F. Benhamed, M. Regnier, A. Muhr-Tailleux, T. Issad, C. Postic. CO, AFEF, Rennes 4-6 Octobre 2023).
10. Deletion of OGT in hepatocytes: a spontaneous model of advanced liver fibrosis associated with reduction of FXR activity. Lucia Parlati, Fadila Benhamed, Marion Regnier, Anne Muhr-Tailleux, Tarik Issad, Catherine Postic. (CA, Boston, 10-14 Novembre 2023).
11. NATURAL HISTORY OF CHRONIC HBEAG NEGATIVE INFECTION AMONG THE ANRS CO22 HEPATHER COHORT. L. Parlati, L. Alric, F. Zoulim, J. Boursier, T. Asselah, S. Pol, V. De Ledinghen, M. Bourlière, D. Thabut, X. Causse, N. Ganne, C. Jézéquel, F. Habersetzer, JP. Bronowicki, C. Lusivika Nzinga, C. Dorival. (CA, Boston, 10-14 Novembre 2023).
12. CHRONIC HBV INFECTION: IMPACT OF HDV COINFECTION AND IFN TREATMENT ON LIVER RELATED OUTCOMES AND MORTALITY IN THE MULTICENTER, PROSPECTIVE, OBSERVATIONAL ANRS CO22

HEPATHER FRENCH COHORT. . Parlati, GP. Pageaux, S. Métivier, T. Decaens, G. Riachi, V. Leroy, V. Ozenne, JC. Duclos Vallée, I. Rosa, V. Loustaud-Ratti, P. Mathurin, J. Gournay, M. Gelu-Simeon, J. Bellet, J. Nicol, F. Carrat. CA, Boston, 10-14 Novembre 2023).

Liste des principales abréviations

A

ALAT: alanine aminotransferase

ALP: alkaline phosphatase

ARE: antioxidant response element

ASAT: aspartate aminotransferase

B

BSEP: bile salt export pump

β OH: β hydroxybutyrate

C

Ccl5: C-C motif chemokine ligand 5

CHOP: CCAAT-enhancer-binding protein homologous protein

Col3a1: collagen type III alpha 1 chain

Col6a1: collagen type VI alpha 1 chain

Cxcl1: C-X-C motif chemokine ligand 1

Cyc: cyclin

Cyp 2c70: CytocromeP 2c70

Cyp7a1: CytocromeP 7a1

D

DDB1: damage specific DNA binding protein 1

DE : genes, gènes exprimés différemment

E

EZH : enhancer of zeste homolog

F

F4/80: marker of murine macrophage

FDR: false discovery rate

Fxr: Farnesoid X receptor

G

G6Pase: Glucose-6-phosphate dehydrogenase

GAPDH, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase

GSH: glutathione réduit

GSSG: glutathione oxidé

Gsta: glutathione S-transferase alpha

Gstm: glutathione S-transferase mu

H

H2A.X: H2A.X variant histone

HBP : hexosamine biosynthesis pathway

HSC : hepatic stellate cells

HE: hematoxylin eosine

HO1: heme oxygenase 1

HNF4 α : hepatocyte nuclear factor 4 α

HSP90: Heat Shock protein 90

I

IL-1 β : interleukin-1 β

J

JNK : c-Jun N-terminal kinase

Ck 7/19: Cytokeratin 7/19

L

LDH: lactate dehydrogenase

Lxr: Liver X receptor

M

MASLD: metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease

MDA : malondialdehyde

MCP1 : monocyte chemoattractant protein-1

MLKL: Mixed lineage kinase domain like pseudokinase

N

NASH: non-alcoholic steatohepatitis

NqO1: NAD(P)H quinone dehydrogenase 1

NRF2: nuclear factor erythroid-derived 2-related factor

O

OGA: O-GlcNAcase

OGT: O-GlcNAc transferase

P

PCNA: proliferating cell nuclear antigen

PEPCK: Phosphoenolpyruvate carboxykinase

PPO : phosphatidylinositol phosphate-binding domain of OGT

R

RT-qPCR : quantitative reverse transcription PCR

RIPK3: Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 3

ROS : espèces réactives de l'oxygène

S

α SMA : α alpha-smooth muscle actin

Shp : small heterodimer partner

SOX9: sex determining region Y-box 2

T

TBP: TATA-box binding protein

TCA: Taurocholic acid

TCDCA: taurochenodeoxycholic acid

TDCA: Taurodeoxycholic acid

TLCA: Taurolithocholic acid

TUDCA: tauroursodeoxycholic acid

T α MCA : tauro-alpha-muricholic acid

T β MCA: tauro-beta-muricholic acid

T ω MCA: tauro- ω -muricholic acid

THCA: trihydroxy-cholestanoic acid

TGF β : transforming growth factor β

TNF α : tumor necrosis factor α

TUNEL: Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labelling

W

WGA: wheat germ agglutinin

Y

YAP: yes-associated protein

Liste des figures

Figure 1 : Anatomie hépatique

Figure 2 : Structure du lobule hépatique

Figure 3 : Le lobule hépatique

Figure 4 : Organisation des cellules endothéliales sinusoidales hépatiques

Figure 5 : Structure des voies biliaires

Figure 6 : Circulation entéro-hépatique des acides biliaires chez l'homme

Figure 7 : Rôle de FXR dans le contrôle du cycle entéro-hépatique des acides biliaires

Figure 8 : Représentation schématique de l'implication des acides biliaires dans la régénération hépatique

Figure 9 : Différents type de réaction ductulaire

Figure 10 : Schéma représentatif et homéostasie de la O-GlcNAcylation

Figure 11 : La voie de biosynthèse des hexosamines

Figure 12 : Structure du gène et de la protéine OGT

Figure 13 : Régulation de l'intronic splicing silencer (ISS) de l'OGT

Figure 14 : Régulation de l'OGT via phosphorylation

Figure 15 : Structure de la protéine O-GlcNAcase (OGA)

Figure 16 : Régulation de l'OGT et de l'OGA

Figure 17 : Causes de la MASLD

Figure 18 : Représentation de l'évolution de MASLD

Figure 19 : Les voies métaboliques affectées chez les patients résistants à l'insuline

Figure 20 : Rôle de la O-GlcNAcylation dans le contrôle du métabolisme hépatique

Figure 21 : Effets de la signalisation de FXR dans le foie et dans l'intestin

Figure 22 : O-GlcNAcylation et réponse au stress du reticulum endoplasmique

Figure 23 : Régulation de la voie de signalisation NRF2 par la O-GlcNAcylation

Figure 24 : La voie de signalisation canonique de TGF β

Figure 25 : O-GlcNAcylation et le cycle cellulaire

Figure 26 : La régénération hépatique est altérée en cas de diminution de la O-GlcNAcylation

Figure 27 : Représentation schématique de la dynamique de la O-GlcNAcylation dans différents types de tumeurs

Figure 28 : Représentation schématique de l'effet oncogène de l'OGT dans le CHC associé à la MASLD

Figure 29 : Conséquences d'une réduction de la O-GlcNAcylation hépatocytaire dans la carcinogénèse hépatique

Figure 30 : L'inactivation de l'OGT hépatocytaire entraîne une inflammation et un stress oxydant hépatique à 2 semaines

Figure 31 : Les souris déficientes en OGT hépatocytaire présentent une réaction ductulaire diffuse à 8 semaines

Figure 32 : Les souris OGT^{LKO} présentent une altération de la composition des acides biliaires sériques et de la voie FXR

Figure 33 : L'inactivation de l'OGT hépatocytaire entraîne une inflammation et une fibrose avancée à 3 mois de vie

Figure 34 : L'inactivation de l'OGT hépatocytaire entraîne une fibrose persistante à 1 an de vie

Figure 35 : Les souris OGT^{LKO} femelles développent des adénomes stéatosiques à 1 an de vie

Figure 36 : L'inhibition spécifique de l'OGT dans les hépatocytes à l'âge adulte entraîne un stress oxydant, des lésions hépatiques et une fibrose initiale du foie 2 semaines après la délétion

Figure 37 : L'inhibition de l'OGT dans les hépatocytes à l'âge adulte entraîne une inflammation hépatique 2 semaines après la délétion

Figure 38 : L'analyse par RNASeq révèle des changements transcriptionnels significatifs dans le foie des souris OGT^{INDLKO} comparées aux souris OGT^{LWT} 2 semaines de délétion

Figure 39 : L'inhibition de l'OGT dans l'hépatocyte à l'âge adulte entraîne un stress oxydant, un stress du RE, des lésions hépatiques et une fibrose initiale du foie 4 semaines après l'induction de la délétion

Figure 40 : L'inhibition de l'OGT hépatocytaire à l'âge adulte entraîne un stress oxydant, un stress du RE, des lésions hépatiques et une fibrose avancée avec des nodules de régénération hépatique à 8 semaines

Figure 41 : Les souris avec une délétion inductible de l'OGT hépatocytaire ont une réaction ductulaire diffuse à 8 semaines

Figure 42 : Les souris avec une délétion inductible de l'OGT hépatocytaire ont une réduction de l'expression de Fxr et de ses cibles 8 semaines après l'induction de la délétion

Figure 43 : L'expression de l'OGT et la O-GlcNAcylation sont augmentées dans la MASLD

Figure 44 : Dimorphisme sexuel du réseau de corrélation et des fonctions des gènes dont l'expression hépatique est corrélée à celle de l'OGT

Sommaire

| | |
|--|----|
| <i>Résumé en Français</i> | 5 |
| <i>Résumé en Anglais</i> | 7 |
| <i>Remerciements</i> | 9 |
| <i>Liste des publications</i> | 11 |
| <i>Liste des communications aux congrès</i> | 13 |
| <i>Liste des principales abréviations</i> | 17 |
| <i>Liste des figures</i> | 21 |
| <i>Sommaire</i> | 25 |
| <i>Introduction</i> | 29 |
| <i>Chapitre 1 : Fonctions hépatiques et différents types cellulaires</i> | 29 |
| 1.1: <i>Anatomie et zonation hépatique</i> | 29 |
| 1.2: <i>Les différents types cellulaires hépatiques</i> | 32 |
| 1.2a: <i>Les hépatocytes</i> | 32 |
| 1.2b: <i>Les cellules étoilées</i> | 34 |
| 1.2c: <i>Les cellules de Kupffer et les macrophages dérivés de la moelle osseuse</i> | 34 |
| 1.2d: <i>Les cellules endothéliales sinusoidales hépatiques</i> | 36 |
| 1.2e: <i>Les cholangiocytes</i> | 37 |
| 1.3: <i>Les acides biliaires</i> | 38 |
| 1.4: <i>La signalisation des acides biliaires</i> | 41 |
| 1.5: <i>Les acides biliaires et la régénération hépatique</i> | 43 |
| 1.6: <i>La réaction ductulaire</i> | 44 |
| | |
| <i>Chapitre 2: Introduction à la O-GlcNAcylation</i> | 49 |
| 2.1: <i>O-GlcNAcylation</i> | 49 |
| 2.2: <i>La O-GlcNAc transférase (OGT)</i> | 52 |
| 2.2a: <i>La O-GlcNAc transférase (OGT) et ses différentes isoformes</i> | 52 |
| 2.2b: <i>Régulation de l'activité de l'OGT via phosphorylation</i> | 56 |
| 2.3: <i>La O-GlcNAcase (OGA)</i> | 58 |
| 2.3a: <i>La O-GlcNAcase (OGA) et ses différentes isoformes</i> | 58 |
| 2.3b: <i>Régulation de l'activité de l'OGA via des modifications post-traductionnelles</i> | 60 |

| | |
|---|-------------|
| 2.4: Dialogue entre la O-GlcNAcylation et les autres modifications post-traductionnelles..... | 62 |
| 2.4a: Interaction avec la phosphorylation | 62 |
| 2.4b: Interaction avec l'ubiquitination..... | 63 |
| Chapitre 3: O-GlcNAcylation et physiopathologie hépatique..... | 67 |
| 3.1: O-GlcNAcylation dans l'hépatopathie stéatosique métabolique | 67 |
| 3.1a: O-GlcNAcylation et résistance à l'insuline..... | 69 |
| 3.1b: O-GlcNAcylation et régulation de la lipogenèse..... | 72 |
| 3.1c: Signalisation des acides biliaires et de FXR dans la MASLD et la MASH | 75 |
| 3.1d: OGT et stress du réticulum endoplasmique (RE)..... | 77 |
| 3.1e: OGT et stress oxydant..... | 79 |
| 3.2: O-GlcNAcylation et fibrose hépatique | 82 |
| 3.3: O-GlcNAcylation et toxicité hépatique..... | 86 |
| 3.4: O-GlcNAcylation et prolifération cellulaire | 87 |
| 3.5: O-GlcNAcylation et cancer du foie | 90 |
| Contexte et objectifs de l'étude | 97 |
| Objectif n° 1 : Caractérisation du phénotype des souris présentant une délétion constitutive de l'OGT dans le foie | .99 |
| Matériels et méthodes..... | 101 |
| Résultats..... | 109 |
| 1) Résumé en Français des résultats publiés dans l'article «OGT acts a critical nutritional node for the control of liver homeostasis»..... | 109 |
| 2) Résultats complémentaires plus détaillés avec des figures originales..... | 114 |
| 3) Publication: «OGT acts a critical nutritional node for the control of liver homeostasis» | 127 |
| Conclusions..... | 207 |
| Objectif n° 2 : Caractérisation du phénotype des souris présentant une délétion inducible de l'OGT dans le foie | .209 |
| Matériels et méthodes..... | 211 |
| Résultats..... | 213 |

| | |
|---|------------|
| 1) La délétion de l'OGT hépatocytaire à l'âge adulte entraîne un stress oxydant et des lésions hépatiques 2 semaines après l'induction de la délétion | 213 |
| 2) Caractérisation des populations immunitaires dans le foie des souris OGT^{INDLKO} | 216 |
| 3) Analyse par RNAseq des transcrits différentiellement exprimés dans le foie des souris OGT^{INDLKO} | 217 |
| 4) La délétion de l'OGT hépatocytaire à l'âge adulte entraîne un stress oxydant et du RE et des lésions hépatiques 4 semaines après l'induction de la délétion | 221 |
| 5) Les souris OGT^{INDLKO} présentent un phénotype d'inflammation, de fibrose hépatique étendue et une réaction ductulaire 8 semaines après l'induction de la délétion | 223 |
| Conclusions..... | 231 |
| Objectif n° 3 : Analyse de l'expression de l'OGT et des niveaux de O-GlcNAcylation dans le foie des patients atteints de MASLD | 233 |
| Matériels et méthodes..... | 235 |
| Résultats..... | 239 |
| Conclusions..... | 247 |
| Discussion | 249 |
| Perspectives | 259 |
| Références | 261 |
| Annexes | 289 |
| New targets for NAFLD | 291 |
| Physiopathologie de la stéatose hépatique non alcoolique (NAFLD) | 307 |

Introduction

Chapitre 1 : Fonctions hépatiques et différents types cellulaires

1.1) Anatomie et zonation hépatique

Le foie est l'organe le plus volumineux du corps, son poids chez l'homme est d'environ 1,5-2 Kg, correspondant à 2,5% du poids corporel. Le foie est recouvert d'une capsule conjonctive, appelée capsule de Glisson, qui le protège, mais ne contribue pas à déterminer sa forme. La surface du foie est lisse et molle, de couleur rouge brunâtre. Le foie, selon la distinction classique, peut être divisé en quatre lobes : droit, gauche, carré et caudé (**Figure 1A**). Le lobe droit est le plus volumineux de l'organe, il a une forme bombée qui comprend, au moins en partie, toutes les trois faces du foie (crâniale, dorsale et caudale). Le lobe gauche a un volume égal à environ la moitié du lobe droit et il a une forme triangulaire. Le lobe carré apparaît comme une saillie quadrangulaire et il est fonctionnellement lié au lobe gauche. Le lobe caudé est une saillie de la face postérieure du foie et il est aussi lié fonctionnellement au lobe gauche. Le foie, cependant, n'est plus divisé, comme il l'était autrefois, sur des repères anatomiques macroscopiques de surface, mais sur la base de critères vasculaires, tels que proposé par Claude Couinaud en 1957 (Couinaud, 1957), car plus étroitement liés à la physiologie de l'organe. La veine hépatique moyenne divise le foie en lobes gauche et droit. La veine hépatique gauche divise le lobe gauche en segments médial (II, III) et latéral (IVa, IVb). La veine hépatique droite divise le lobe hépatique droit en segments antérieurs (V et VIII) et postérieurs (VI et VII). Le lobe caudé (I) a une veine hépatique séparée qui se draine directement dans la veine cave inférieure (**Figure 1**

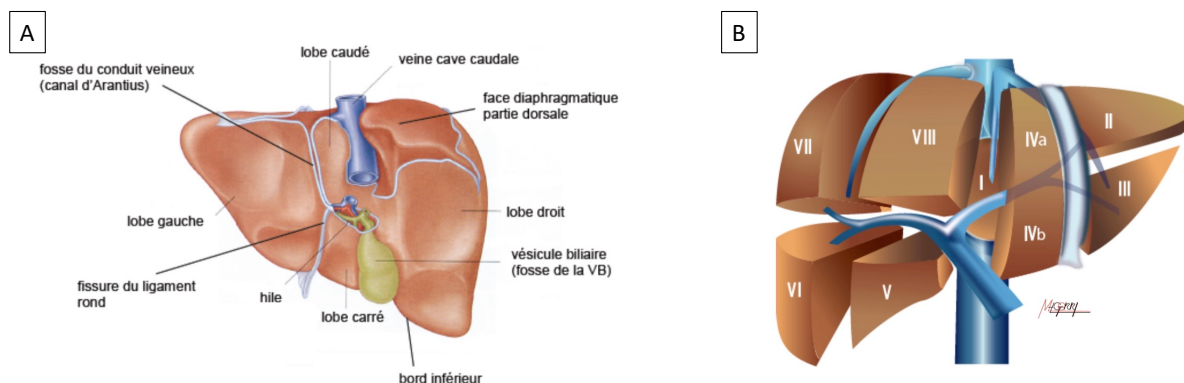


Figure 1 : Anatomie hépatique

A. Vue dorsale du foie avec division classique en lobe droit, gauche, carré et caudé. Le lobe droit est le plus volumineux de l'organe, il a une forme bombée qui comprend, au moins en partie, toutes les trois faces du foie (crâniale, dorsale et caudale). Le lobe gauche a un volume égal à environ la moitié du lobe droit et il a une forme triangulaire. Le lobe carré apparaît comme une saillie quadrangulaire et il est fonctionnellement lié au lobe gauche. Le lobe caudé est une saillie de la face postérieure du foie et il est aussi lié fonctionnellement au lobe gauche. Le hile hépatique est composé par la veine porte, l'artère hépatique et la voie biliaire principale. Le canal veineux d'Arantius à l'état embryonnaire réunit la veine porte à la veine cave caudale et s'oblitère à la naissance. Le ligament rond du foie, ou ligament hépato-ombilical et un vestige de la veine ombilicale.

B. Segmentation hépatique sur la base de critères vasculaires et représentation du système porte hépatique. La veine hépatique moyenne divise le foie en lobes gauche et droit. La veine hépatique gauche divise le lobe gauche en segments médial (II, III) et latéral (IVa, IVb). La veine hépatique droite divise le lobe hépatique droit en segments antérieurs (V et VIII) et postérieurs (VI et VII). Le lobe caudé (I) a une veine hépatique séparée qui se draine directement dans la veine cave inférieure (<https://radiopaedia.org/cases/couinaud-classification-diagram>).

Le foie est un des trois systèmes portes de notre organisme avec le système hypothalamo-hypophysaire et le système surrénalien. Le foie possède deux systèmes veineux : le système veineux porte et le système veineux hépatique. Le système porte est constitué de la veine porte, qui est formée par la confluence des veines splénique, mésentérique supérieure et mésentérique inférieure. La veine porte possède la fonction de transporter le sang provenant de l'intestin et de la rate vers le foie, constituant un système porte. Les trois veines hépatiques (gauche, moyenne et droite) tributaires de la veine cave inférieure, constituent le deuxième système veineux du foie. Leur trajet dans le parenchyme hépatique permet de diviser le foie en secteurs, leurs pédoncules permettent de diviser chaque secteur en segments supplémentaires, les lobules hépatiques. La plus petite unité fonctionnelle du lobule hépatique est

l'acinus hépatique. Un acinus hépatique est une section de parenchyme de forme ovale dont le grand axe rejoint deux veines centro-lobulaires.

D'un point de vue fonctionnel, chaque acinus est divisible en trois zones. La zone 1, péri-portale, est la plus proche de la ramification de la veine porte et des branches terminales des vaisseaux afférents. La zone 2, intermédiaire, est une zone triangulaire qui comprend le parenchyme du lobule dans sa partie médiane et la zone 3, centro-lobulaire, est proche de la veine centro-lobulaire. L'acinus assume ainsi une forme ovale ou rhomboïdale (**Figure 2**). La distribution anatomique des zones correspond à une distribution fonctionnelle : I) La zone 1 est située à côté de la triade portale ; les hépatocytes de la zone 1 sont les mieux perfusés et les premiers à se régénérer après une atteinte hépatique du fait de leur proximité aux nutriments provenant du système digestif et au sang oxygéné. Les hépatocytes de cette zone sont impliqués dans le métabolisme oxydant tel que la β -oxydation, le catabolisme des acides aminés, la gluconéogenèse, la production du cholestérol et de la bile ; II) La zone 2 est une région péricentrale des hépatocytes, située entre la zone 1 et la zone 3 ; III) La zone 3 est située à côté de la veine centrale et, par conséquent, de plus faible perfusion. Les hépatocytes localisés dans cette zone sont principalement impliqués dans la détoxification, la céto-genèse, la glycolyse, la lipogenèse, la synthèse du glycogène et de la glutamine.

La protéine associée à Yes (YAP) et la voie de la caténine Wnt/ β sont des régulateurs principaux de la zonation du foie. Les hépatocytes péri-portaux sont caractérisés par une activation plus élevée de la signalisation YAP, impliquée dans la prolifération, la survie et la différenciation (Patel, Camargo et Yimlamai, 2017). L'invalidation spécifique de YAP dans les hépatocytes chez la souris entraîne, non seulement, des défauts de survie des hépatocytes, mais également un défaut profond de développement des voies biliaires (Zhang et al., 2010). Les hépatocytes péricentraux présentent une activation plus élevée de la signalisation Wnt/ β caténine, impliquée dans la détermination de la polarité et la prolifération cellulaire, avec l'expression de ses gènes cibles traditionnels tels que l'Axin2, la glutamine synthétase et les enzymes du cytochrome P450. L'invalidation spécifique de la β -caténine hépatocytaire chez la souris induit un phénotype péri-portal dans l'ensemble du foie (Russel et Monga, 2018).

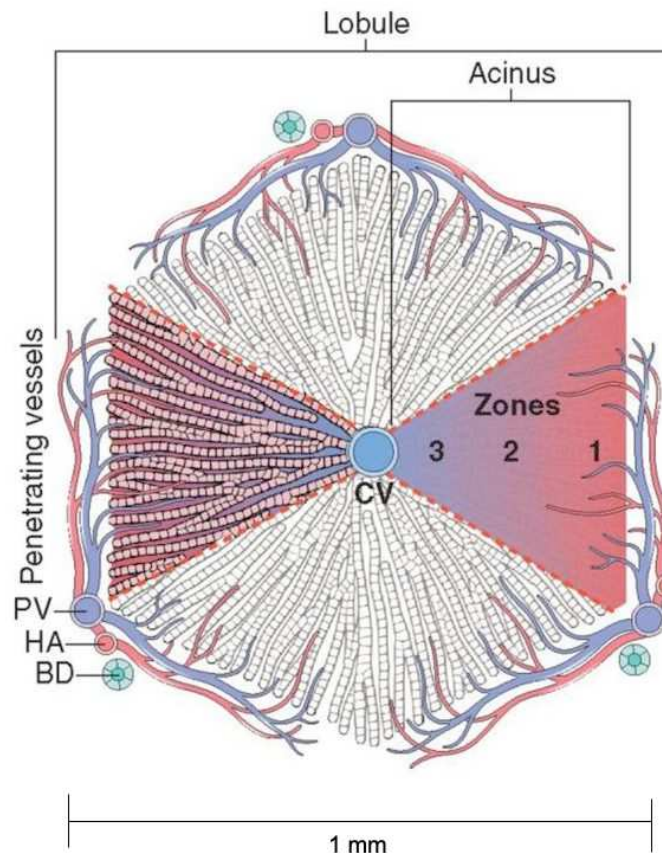


Figure 2 : Structure du lobule hépatique

Le foie est composé de lobules constituant ses unités fonctionnelles. Chaque lobule est composé d'une veine centrale et de couches d'hépatocytes qui rayonnent vers la triade porte. La triade porte est formée par une branche de l'artère hépatique (HA), de la veine porte (PV) et du canal biliaire (BD). La figure représente la répartition des zones dans l'acinus. <https://slideplayer.fr/slide/12415607/>

1.2) Les différents types cellulaires hépatiques

1.2a) Les hépatocytes

Les hépatocytes représentent environ 70% des cellules du foie chez l'homme et sont de grandes cellules épithéliales polyédriques, avec des gros noyaux ronds situés au centre de la cellule (2 ou plus), regroupés en plaques interconnectées qui sont disposées en milliers de petits lobules polyédriques. Les hépatocytes sont disposés en filières composées d'une seule cellule avec un sinusoïde des deux côtés, exposant ainsi l'hépatocyte au flux sanguin sur deux surfaces. Au sein de la filière, chaque hépatocyte jouxte sa surface extérieure à la cellule adjacente permettant ainsi de

garder la polarisation des hépatocytes (Gissen and Arias, 2015). La bile produite par les hépatocytes est collectée dans des sillons au niveau de la surface externe de la membrane cellulaire, appelée héli-canalicule.

Les héli-canalicules de deux hépatocytes adjacents forment un canalicule biliaire intercellulaire. Le contenu du canalicule biliaire intercellulaire s'écoule dans un réseau de plusieurs canaux et conduits plus grands qui finissent par se fondre dans les voies biliaires situées dans les espaces porte. L'espace de Disse est l'espace entre les hépatocytes et les cellules tapissant la paroi sinusoidale (**Figure 3**). Différents types de cellules, y compris les cellules endothéliales sinusoidales, les cellules de Kupffer et cellules étoilées hépatiques, chacun avec des fonctions spécialisées, recouvrent les sinusoides hépatiques.

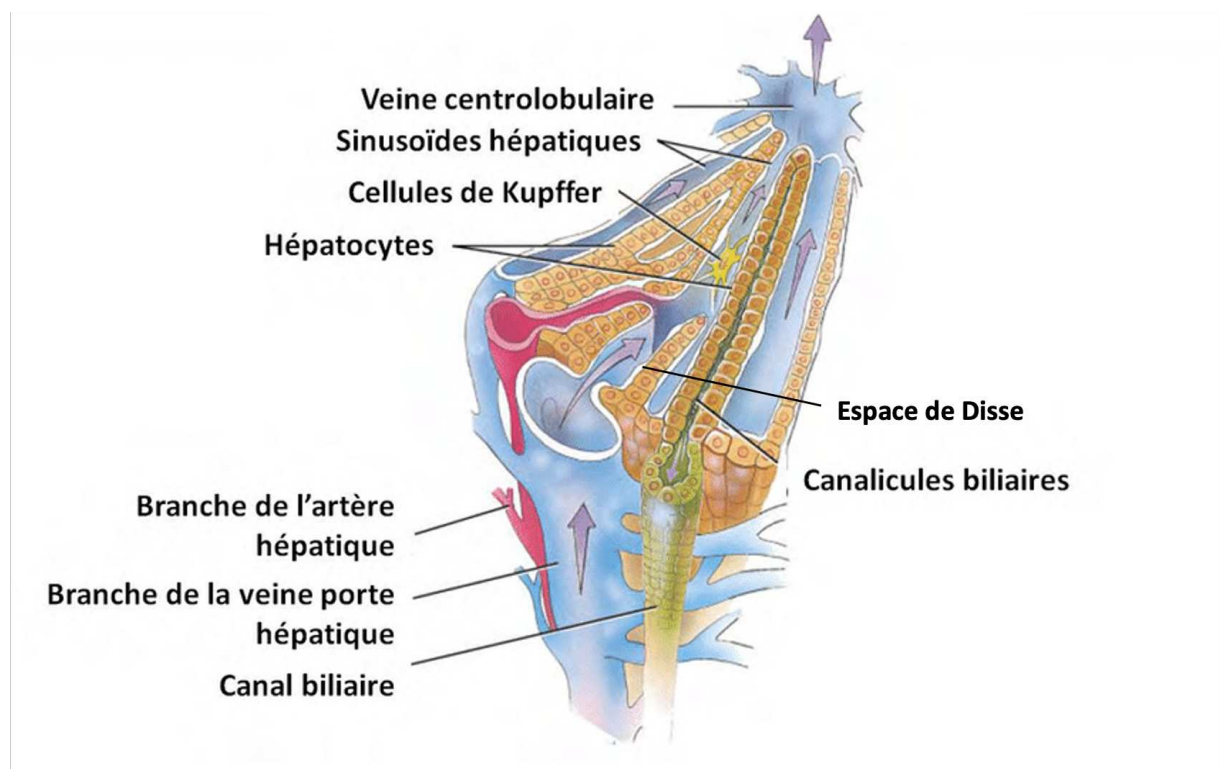


Figure 3 : Le lobule hépatique

Le lobule hépatique, une unité fonctionnelle du foie. Au centre de chaque lobule, se trouve la veine centro-lobulaire. Elle est habituellement dépourvue de paroi conjonctive sauf si elle est proche d'une veine sus-hépatique. Sa paroi est percée d'orifices qui mettent sa lumière en communication avec celle des sinusoides drainées par la veine centro-lobulaire. Des travées cellulaires, très sinueuses et fréquemment anastomosées entre elles, s'étendent de façon radiaire de la veine centro-lobulaire vers la périphérie du lobule. Les héli-canalicules de deux hépatocytes adjacents forment un canalicule biliaire intercellulaire. Le contenu du canalicule biliaire intercellulaire s'écoule dans un réseau de plusieurs canaux et conduits plus grands qui finissent par se fondre dans les voies biliaires situées dans les espaces porte. L'espace de Disse est l'espace entre les hépatocytes et les cellules tapissant la paroi sinusoidale (Adaptée de Malarkey et al. 2005).

Les hépatocytes ont diverses fonctions métaboliques : la production et l'excrétion de la bile à partir du métabolisme de la bilirubine, la régulation de l'homéostasie glucidique, la synthèse des lipides et la sécrétion des lipoprotéines plasmatiques et le contrôle du métabolisme du cholestérol. Les hépatocytes sont également impliqués dans la synthèse de l'urée, de l'albumine sérique, des facteurs de la coagulation, des enzymes et de nombreuses autres protéines plasmatiques (globuline, fibrinogène et prothrombine). Enfin, les hépatocytes sont responsables du métabolisme et de l'inactivation des médicaments et des toxines et servent aussi de réservoir du glycogène, du fer et de plusieurs vitamines (vitamine A, vitamine D, vitamine E, vitamine K, vitamine B12).

1.2b) Les cellules étoilées

Les cellules étoilées sont des cellules mésenchymateuses qui appartiennent à la famille de myofibroblastes (Friedman, 2008). Ces cellules sont situées dans l'espace de Disse à l'état quiescent. Elles contiennent des gouttelettes lipidiques riches en vitamine A et synthétisent et sécrètent une variété de protéines de la matrice extracellulaire. L'activation des cellules étoilées à partir d'une cellule de stockage de vitamine A quiescente en un phénotype proliférant et fibrogène « de type myofibroblaste » est un événement principal après une atteinte hépatique (Sato et al., 2003). L'activation des cellules étoilées est un processus complexe dans la fibrogenèse hépatique, qui peut être induite par un grand nombre de signaux cytoplasmiques et/ou nucléaires (Hou et Syn, 2018, Lemoine et al., 2013).

1.2c) Les cellules de Kupffer et les macrophages dérivés de la moelle osseuse

Les cellules de Kupffer sont classées dans la catégorie des macrophages tissulaires et, chez l'homme, représentent la plus grande population de ce type dans le corps. Elles représentent 20 à 35 % de toutes les cellules non parenchymateuses du foie. (Zeng et al., 2013 ; Li et al., 2014). Les cellules de Kupffer sont préférentiellement ancrées dans la zone péri-portale du lobule hépatique (Bouwens et al., 1986).

Les cellules de Kupffer ont des formes irrégulières avec de nombreuses extensions cytoplasmiques et contiennent un grand nombre de phagosomes et de lysosomes

associés à leur fonction endocytaire. Elles sont des « cellules sentinelles » qui se déplacent le long des sinusoides (Kan et al., 1995) et phagocytent les corps étrangers présents dans la circulation sanguine. Les cellules de Kupffer jouent également un rôle important pour l'élimination des particules, des érythrocytes, des cellules parenchymateuses hépatiques et des endotoxines dérivées du système intestinal, assurant l'homéostasie hépatique (Dixon et al., 2013). De plus, elles sont considérées comme un type de cellules présentatrices d'antigène assurant un lien entre le système immunitaire inné et adaptatif (Barreby et al., 2022). Généralement, les cellules de Kupffer exercent un rôle protecteur dans des situations telles que les lésions hépatiques induites par les médicaments et les toxines. Cependant, une dérégulation dans le contrôle des réponses inflammatoires peut contribuer à des conditions pathologiques telles que la stéatohépatie métabolique (Tacke, 2017, Peiseler et al., 2022).

Il a été suggéré que l'origine des cellules de Kupffer implique deux mécanismes : la reconstitution par auto-prolifération locale et le recrutement à partir de monocytes dérivés de la moelle osseuse (Davies et al., 2013). En 2012, il a été suggéré que les cellules de Kupffer murines provenaient du sac vitellin embryonnaire (Schulz et al., 2012). Cependant, les macrophages dérivés de la moelle osseuse peuvent également se différencier en cellules de Kupffer. Les macrophages effectuent un processus de "spécialisation" appelé polarisation.

In vitro, les macrophages changent leur état de polarisation en fonction du type de stimuli tels que les cytokines, les produits microbiens, les pathogènes ou d'autres modulateurs (Murray et al., 2014). Toutefois, *in vivo*, le processus de polarisation est plus complexe, car les macrophages sont suffisamment plastiques pour intégrer plusieurs stimuli. Ceci a conduit à une remise en question, en 2016 (Nahrendorf et Swirski, 2016), de la nomenclature traditionnelle M1/M2 pour la polarisation des macrophages (Mills et al., 2000) faisant référence à M1 pour les macrophages activés par l'IL1 β (*Interleukin 1 β*), l'IL-6 (*Interleukin 6*), le TNF α (*tumor necrosis factor α*) ou LPS (*lipopolysaccharide*) ayant pour conséquence d'activer une réponse inflammatoire et M2 pour ceux activés par l'IL-4 (*Interleukin 4*), L'IL-10 (*Interleukin 10*), l'IL-13 (*Interleukin 13*) ou le TGF β (*transforming growth factor β*) conduisant à une réponse anti-inflammatoire.

Plus récemment ont été identifiées deux populations distinctes de cellules de Kupffer partageant une signature centrale tout en exprimant de manière différentielle de

nombreux gènes et protéines : une population majeure de cellules de Kupffer 1 (85%) et une population mineure de cellules de Kupffer 2 (15%). Ces dernières expriment des gènes impliqués dans les processus métaboliques, y compris le métabolisme des acides gras à la fois à l'état d'équilibre et dans l'obésité et dans la stéatose hépatique. Chez la souris, la caractérisation fonctionnelle par déplétion des cellules de Kupffer 2 ou silençage ciblé du transporteur des acides gras CD36 a mis en évidence une contribution cruciale des cellules de Kupffer 2 dans le stress oxydant hépatique associé à l'obésité (Bleriot et al., 2021).

1.2d) Les cellules endothéliales sinusoidales hépatiques

Les cellules endothéliales sinusoidales hépatiques constituent la population de cellules hépatiques non parenchymateuses la plus abondante. Les cellules endothéliales constituent une population vasculaire recevant du sang de l'artère hépatique et de la veine porte, ayant ainsi la capacité d'éliminer et de recycler les nutriments des hépatocytes (Shetty, Lalor et Adams, 2018). Morphologiquement et fonctionnellement, les cellules endothéliales présentent une similitude avec les cellules endothéliales lymphatiques (Lalor et al., 2006) puisque les deux possèdent une membrane basale minimale, et des jonctions cellulaires organisées (Geraud et al., 2012). Une caractéristique qui distingue les cellules endothéliales des autres populations endothéliales hépatiques est leur organisation fenêtrée. La fenestration où les pores membranaires des cellules endothéliales sont organisés en plaques tamis et dépourvus de diaphragme ou de lame basale, leur conférant la caractéristique de haute perméabilité (Poisson et al., 2017) (**Figure 4**). Les cellules endothéliales jouent également un rôle dans le maintien de l'homéostasie hépatique en intervenant dans la régulation du tonus vasculaire, de l'inflammation et de la thrombose (Garcia-Sancho et al., 2021). Elles sont impliquées aussi dans la réponse immunologique innée et adaptative, y compris la présentation de l'antigène (Lalor et al., 2002) ou le recrutement des leucocytes (Xu et al., 2003). De plus, les cellules endothéliales sont très importantes pour favoriser le dialogue cellulaire qui se met en place lors d'une atteinte hépatique aiguë ou chronique (lésions d'ischémie-reperfusion, toxicité hépatique d'origine médicamenteuse, infections bactériennes et virales, maladie alcoolique et métabolique du foie, carcinome hépatocellulaire) (Shetty, Lalor et Adams, 2018,

Garcia-Sancho et al., 2021).

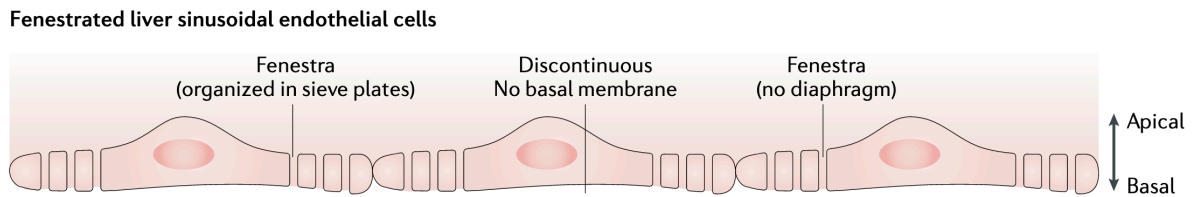


Figure 4 : Organisation des cellules endothéliales sinusoidales hépatiques

Les cellules endothéliales sont des cellules polarisées présentant des fenestrations organisées en plaques criblées. Elles possèdent une membrane basale minimale, et des jonctions cellulaires organisées. Une caractéristique qui distingue les cellules endothéliales des autres populations endothéliales hépatiques est leur organisation fenestrée. La fenestration où les pores membranaires des cellules endothéliales sont organisés en plaques dépourvues de diaphragme ou de lame basale, leur conférant la caractéristique de haute perméabilité (D'après Shetty, Lalor et Adams, 2018).

1.2e) Les cholangiocytes

Les cholangiocytes sont une population hétérogène et hautement dynamique de cellules épithéliales qui tapissent un réseau tridimensionnel de voies biliaires, connu sous le nom d'arbre biliaire. Les cholangiocytes représentent 3-5% de la masse totale des cellules hépatiques (Alpini et al., 2002). Leur principale fonction physiologique réside dans la modification de la bile canaliculaire hépatique (c'est-à-dire la bile primaire) lors de son transport le long de l'arbre biliaire. La modification de la bile se produit par le transport coordonné de divers ions, solutés et eau à travers les membranes plasmiques apicales et basolatérales des cholangiocytes. La production de la bile est modulée par des hormones, des peptides, des nucléotides, des neurotransmetteurs et d'autres molécules, y compris les acides biliaires, par diverses voies de signalisation intracellulaires et cascades régulatrices. Les cholangiocytes sont des cellules polarisées divisées en sous-types différents (**Figure 5**).

Au sein du canal de Hering résident des cholangiocytes immatures, cellules progénitrices peu différenciées et considérées comme progénitrices, qui participent au renouvellement et à la régénération de l'épithélium, les cellules progénitrices hépatiques. Cependant, les cholangiocytes augmentent leur degré de différenciation (polarité cellulaire, réponse à l'expression hormonale et des récepteurs et

transporteurs) le long de l'arbre biliaire, passant de petits cholangiocytes à grands cholangiocytes (Alpini et al., 1996 ; Han et al., 2013 ; Banales et al., 2019).

Dans des conditions physiologiques, les cholangiocytes contribuent à la composition et au volume de la sécrétion biliaire. En réponse à des stress cellulaires et des dommages hépatiques, les cholangiocytes peuvent modérer, initier ou exacerber la physiopathologie hépatique d'une manière dépendante du contexte : mort cellulaire, prolifération, transdifférenciation, sénescence et acquisition d'un phénotype neuroendocrinien (Hrncir et al., 2023). De plus les cholangiocytes jouent un rôle dans les réponses immunitaires, l'inflammation hépatique et le développement de la fibrose hépatique (Franchitto et al., 2013).

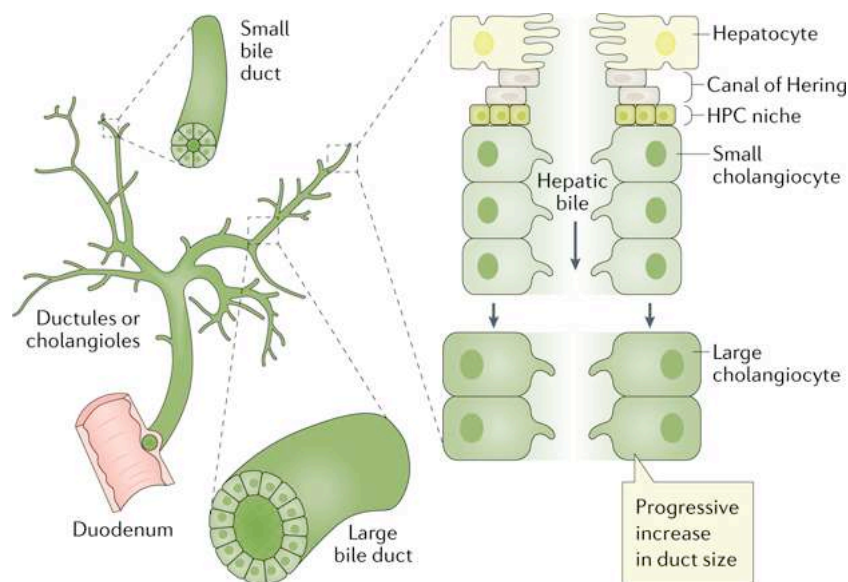


Figure 5 : Structure des voies biliaires

La bile produite par les hépatocytes (bile primaire ou hépatique) est délivrée dans les voies biliaires. Les canaux de Hering assurent le continuum entre le canalicule hépatocyttaire et les ductules ou les cholangioles, les petites voies biliaires et les grandes voies biliaires dans lesquelles la bile hépatique est modifiée pour devenir la bile canalaire. On pense également qu'une niche de cellules progénitrices hépatiques réside à l'interface des cellules tapissant les canaux de Hering et la plaque hépatocyttaire. Le transport épithélial biliaire actif des électrolytes et des solutés se produit dans les petites et grandes voies biliaires et détermine le mouvement vectoriel de l'eau (c'est-à-dire l'absorption ou la sécrétion) à travers cholangiocytes, modifiant ainsi la composition et le flux de la bile canalaire. HPC : cellules progénitrices hépatiques. (D'après Banales et al., 2019).

1.3) Les acides biliaires

Les acides biliaires sont des métabolites amphipathiques du cholestérol qui solubilisent les lipides primaires en formant des micelles dans l'intestin grêle pour

faciliter leur absorption ou leur élimination. De plus, les acides biliaires régulent l'homéostasie des lipides et du glucose et la signalisation immunitaire (Fuchs et Trauner, 2022). Le pool des acides biliaires se compose des acides biliaires primaires et secondaires.

Les acides biliaires primaires sont synthétisés par les hépatocytes, conjugués aux acides aminés et stockés dans la vésicule biliaire, pour être ensuite sécrétés dans le duodénum et faciliter l'absorption des lipides alimentaires, du cholestérol et des vitamines liposolubles. Les acides biliaires secondaires se forment dans le côlon où les bactéries résidentes catalysent la 7α -déhydroxylation des acides biliaires primaires (**Figure 6**). Les acides biliaires primaires et secondaires peuvent retourner au foie *via* la circulation portale (circulation entéro-hépatique des acides biliaires) (**Figure 6**).

La biosynthèse des acides biliaires à partir du cholestérol est initiée soit par le CYP7A1 (cytochrome P450 7A1) dans la voie classique des hépatocytes ou le CYP27A1 (cytochrome P450 27A1) dans la voie alternative (acide) qui s'effectue dans les tissus extra-hépatiques. Les produits sont les acides biliaires primaires : l'acide cholique (CA) et l'acide chénodésoxycholique (CDCA) chez l'homme (Hamilton JP et al., 2007) et l'acide murocholique (MCA) chez la souris. Les acides biliaires primaires sont conjugués avec la glycine ou la taurine chez l'homme, ou avec la taurine chez la souris, pour former des sels biliaires qui sont stockés dans la vésicule biliaire.

Les acides biliaires sont libérés dans le duodénum lors d'un repas et sont métabolisés par le microbiote le long du tube digestif (Jones et al., 2008). Environ 95% des acides biliaires sont réabsorbés, avant qu'ils n'atteignent l'iléon terminal où ils sont recyclés *via* la circulation entéro-hépatique (Hofmann, 2009). Les 5% des acides biliaires non réabsorbés dans l'iléon sont métabolisés dans le côlon, où la majorité de la population du microbiote intestinal réside, facilitant ainsi la production d'acides biliaires secondaires : l'acide désoxycholique (DCA) et l'acide lithocholique (LCA).

La composition du microbiote intestinal et la régulation du transport impactent sur le pool des acides biliaires. La composition des acides biliaires murins est différente de celle de l'homme (Thakare et al., 2018). En effet, les bactéries de l'intestin murin peuvent produire des acides biliaires secondaires plus diversifiés que les bactéries intestinales humaines (Wahlström, et al., 2017). En plus des acides biliaires primaires

humains CA et CDCA, les souris produisent de l'acide ursodésoxycholique (UDCA) et les acides α -MCA et β -MCA à partir des acides CDCA et UDCA, respectivement (Li, J. & Dawson, 2019). En comparaison à l'espèce humaine, les souris ont une prédominance d'acides biliaires primaires en raison de l'expression de CYP2A12 (cytochrome P450 2A12), qui convertit le DCA et le LCA en CA et CDCA, respectivement (Honda, A. et al. 2020).

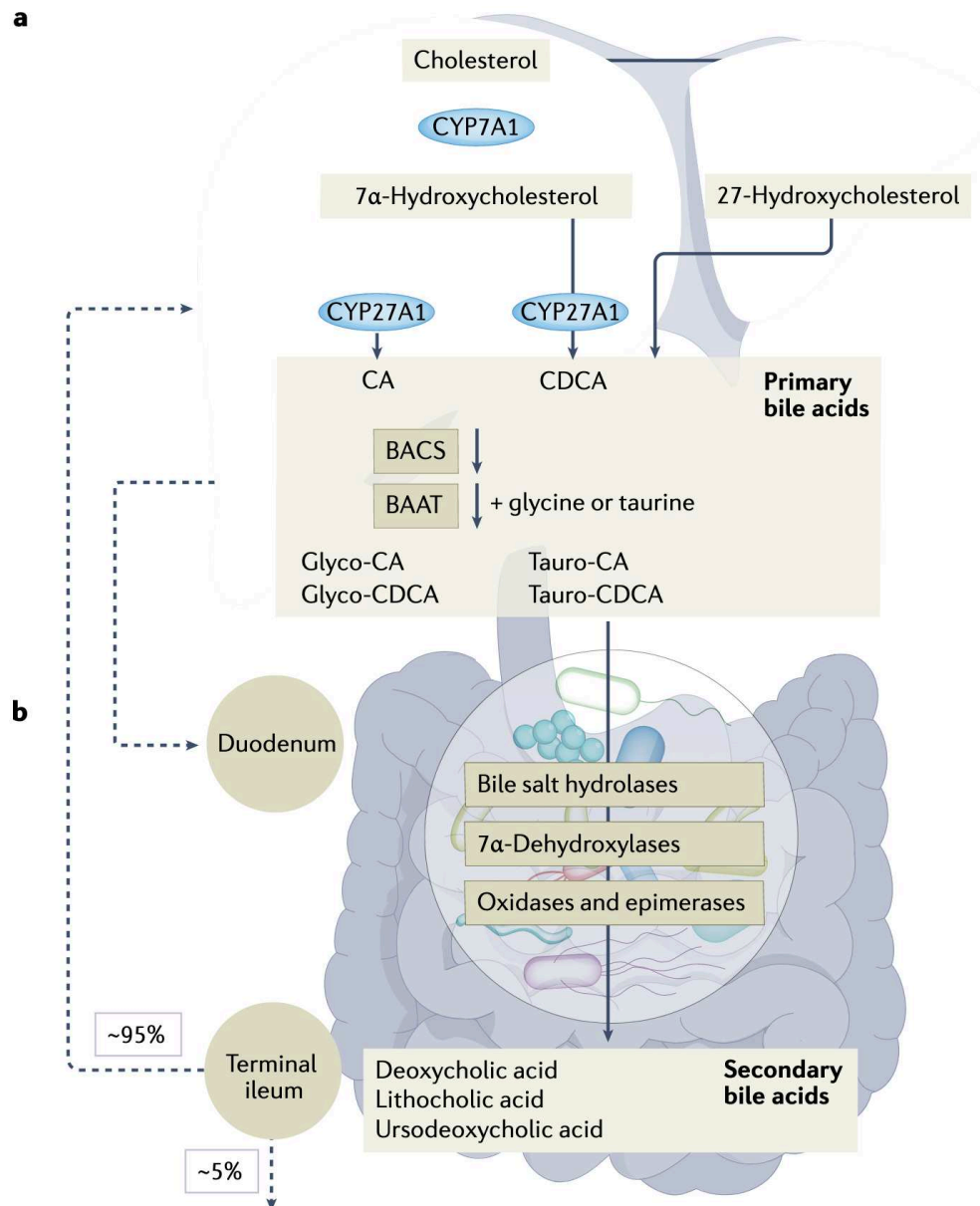


Figure 6 : Circulation entéro-hépatique des acides biliaires chez l'homme

a) Les acides biliaires primaires sont synthétisés à partir du cholestérol dans le foie par la voie classique médiée par le CYP7A1 ou par la voie alternative, médiée par le CYP27A1. La BACS (Bile Acyl-CoA Synthetase) et la BAAT (Bile acyl-CoA: amino acid acyltransferase)

catalysent ensuite l'amidation des acides biliaires (conjugaison) avec la glycine ou la taurine pour former les sels biliaires, qui seront stockés dans la vésicule.

b) Le microbiote intestinal métabolise les acides biliaires sécrétés dans le duodénum en acides biliaires secondaires. La réabsorption d'environ 95 % des acides biliaires qui atteignent l'iléon terminal permet leur recyclage par le foie. CA, acide cholique ; CDCA, acide chénodésoxycholique; CYP8B1 : Cytochrome P450 8B1 (D'après Collins et al., 2023)

1.4) La signalisation des acides biliaires

Les acides biliaires agissent sur les voies métaboliques à travers la liaison à leurs récepteurs : FXR (*farnesoid X receptor*), VDR (*vitamin D receptor*), PXR (*pregnane X receptor*) et CAR (*constitutive androstane receptor*). Les acides biliaires sont impliqués dans l'homéostasie des lipides et du glucose, le métabolisme des xénobiotiques et les voies immunorégulatrices (Thibaut & Bindels, LB, 2022).

FXR est le principal récepteur des acides biliaires car ses agonistes comprennent à la fois le CA libre et conjugué, le CDCA, le LCA et le DCA (Makishima et al., 1999, Parks et al., 1999), tandis que l'acide tauro- β -MCA est un antagoniste (Sayin et al., 2013). Dans l'iléon, l'activation de FXR induit la sécrétion de FGF15 chez la souris/FGF19 chez l'homme (*fibroblast growth factors 15/19*), qui est véhiculé dans le foie *via* la circulation portale et au niveau hépatique inhibe le métabolisme des acides biliaires *via* le récepteur FGF (FGFR) (Inagaki et al., 2005 ; Holt et al., 2003) (**Figure 7**).

Les acides biliaires possèdent des propriétés détergentes, qui peuvent entraîner un stress oxydant, une apoptose et des dommages aux hépatocytes lorsqu'ils sont présents à des concentrations élevées au niveau intrahépatique (Monte et al., 2009). La cholestase est le phénomène d'altération de la production d'acides biliaires et/ou de réduction de leur flux sécrétoire. Elle peut être due à une altération de la sécrétion des acides biliaires par les hépatocytes ou à une obstruction au niveau des voies biliaires (Trauner, Meier et Boyer, 1998).

L'activation de FXR dans le foie contrôle la synthèse des acides biliaires en augmentant l'expression de SHP (*small heterodimer partner*) (Goodwin et al., 2000, Lu et al., 2000). L'activation de FXR inhibe la voie classique de synthèse des acides biliaires en réduisant l'expression de CYP7A1 et de CYP8B1. (Inagaki et al. 2005, Sanyal et al. 2007, Sinal et al., 2000).

Pour atténuer la toxicité des acides biliaires, l'activation de FXR induit la BA-CoA (*Bile Acyl-CoA Synthetase*) et la BAAT (*Bile acyl-CoA: amino acid acyltransferase*) dans le

foie, limitant ainsi l'accumulation des acides biliaires toxiques non conjugués (Pircher et al., 2003). L'activation de FXR stimule également l'expression de la pompe canaliculaire d'exportation des sels biliaires (BSEP) qui permet l'élimination des acides biliaires intra-cellulaires hépatocytaires et une réduction de l'expression des transporteurs hépatiques qui captent la bile (par exemple, OATP1 (*Organic anion transporting polypeptide*)) (Sinal et al., 2000).

En résumé, l'augmentation des acides biliaires toxiques non conjugués active FXR permettant de réduire la biosynthèse des acides biliaires et d'induire leur exportation du foie.

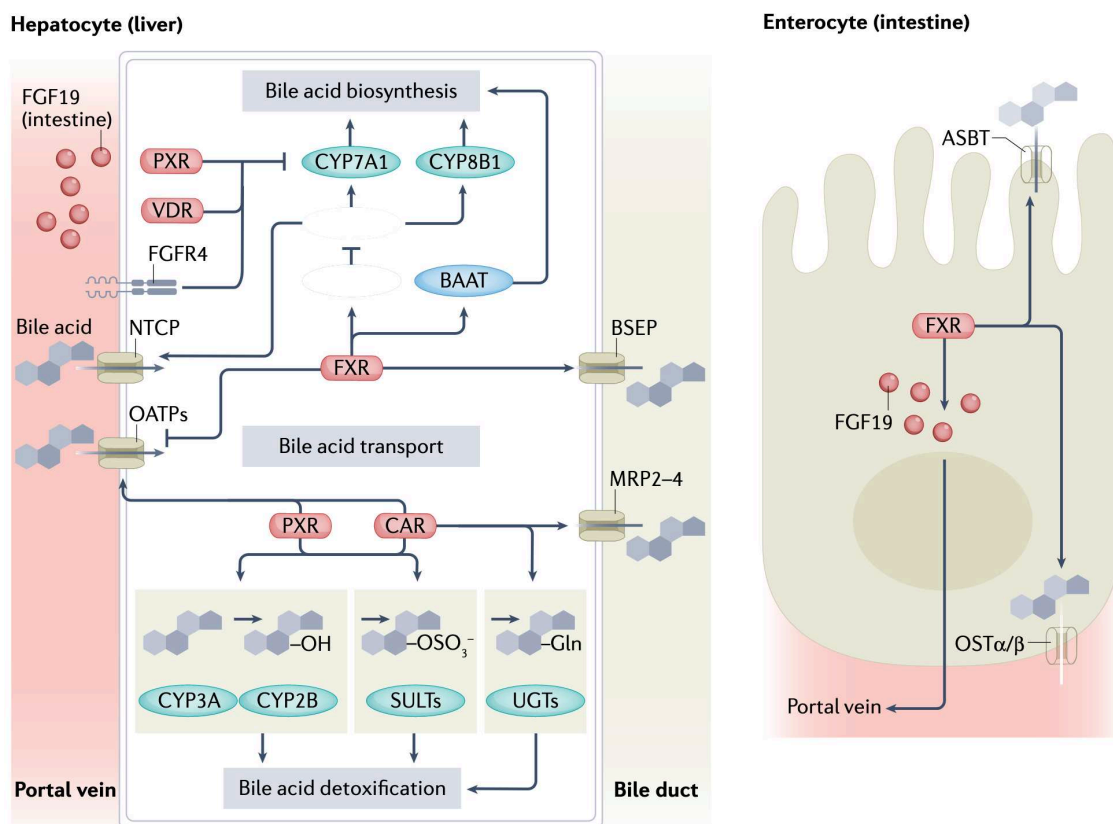


Figure 7 : Rôle de FXR dans le contrôle du cycle entéro-hépatique des acides biliaires

FXR inhibe la synthèse des acides biliaires en inhibant (via l'induction de SHP) l'expression de l'enzyme limitante de cette voie, la CYP7A1. L'activation de FXR stimule également les enzymes impliquées dans la détoxification des acides biliaires, comme les glucuronotransférases (UGT2B4) et les sulfotransférases (SULT2A1). FXR augmente la sécrétion des acides biliaires dans la bile en induisant l'expression des transporteurs spécifiques (BSEP, MRP2-4) et diminue leur recapture hépatique en inhibant l'expression des transporteurs NTCP et OATPs. Au niveau intestinal, FXR inhibe la capture et l'exportation des acides biliaires en diminuant l'expression des transporteurs ASBT et OSTα/b. En résumé, l'activation de FXR protège l'hépatocyte d'une surcharge toxique en acides biliaires. MRP 2-4 : multi drug resistant protein 2-4, OATP : organic anion-transporting polypeptides, NTCP:

sodium taurocholate cotransporting polypeptide, ASBT: apical sodium-dependent bile acid cotransporter, OST α/β :organic solute transporter α/β (D'après Collins et al., 2023).

1.5) Les acides biliaires et la régénération hépatique

Un autre rôle important des acides biliaires est le contrôle de la régénération hépatique à travers leur interaction avec le récepteur FXR.

D'un point de vue moléculaire, les récepteurs FXR intestinaux et hépatiques contribuent à la régénération du foie après hépatectomie partielle d'une double manière : (i) ils protègent le foie contre le stress des acides biliaires *via* la suppression de la CYP7A1, l'enzyme limitante dans la synthèse des acides biliaires («réponse adaptative des hépatocytes»); et (ii) ils favorisent la prolifération des hépatocytes, notamment par l'induction de l'expression de FoxM1b (*Forkhead box protein M1*) (Huang et al., 2006, Zhang et al., 2012, Li et al., 2021), les deux actions étant potentiellement liées (**Figure 8**). L'entérokinine murine FGF15 (ou FGF19 chez l'homme) est considérée comme un médiateur principal du récepteur FXR lors de la régénération du foie. Dans les hépatocytes, l'interaction de FGF 15/19 avec FGFR est responsable de la diminution de CYP7A1 et donc de l'inhibition subséquente de la synthèse des acides biliaires (Inagaki et al., 2005). Les souris globalement invalidées pour FGF15 (souris *Fgf15*^{-/-}) après hépatectomie partielle présentent une récupération retardée de la masse hépatique, une survie plus faible avec des niveaux élevés persistants d'acides biliaires intrahépatiques et une nécrose hépatique massive. Fait intéressant, l'administration de FGF15 (par injection d'adénovirus) améliore la survie après hépatectomie partielle non seulement chez les souris globalement invalidées *Fgf15*^{-/-}, mais aussi chez les souris de type sauvage après une résection hépatique étendue à 86 % (Uriarte et al., 2013), suggérant que cette entérokinine serait un acteur majeur dans "l'adaptation des entérocytes" aux acides biliaires post- hépatectomie partielle.

Chez l'homme, il a été démontré que les taux sériques (systémiques et portaux) des acides biliaires sont augmentés après une résection hépatique. La concentration sérique des acides biliaires est corrélée aux niveaux d'expression de FXR et à la récupération du volume hépatique (Koelfat et al., 2021).

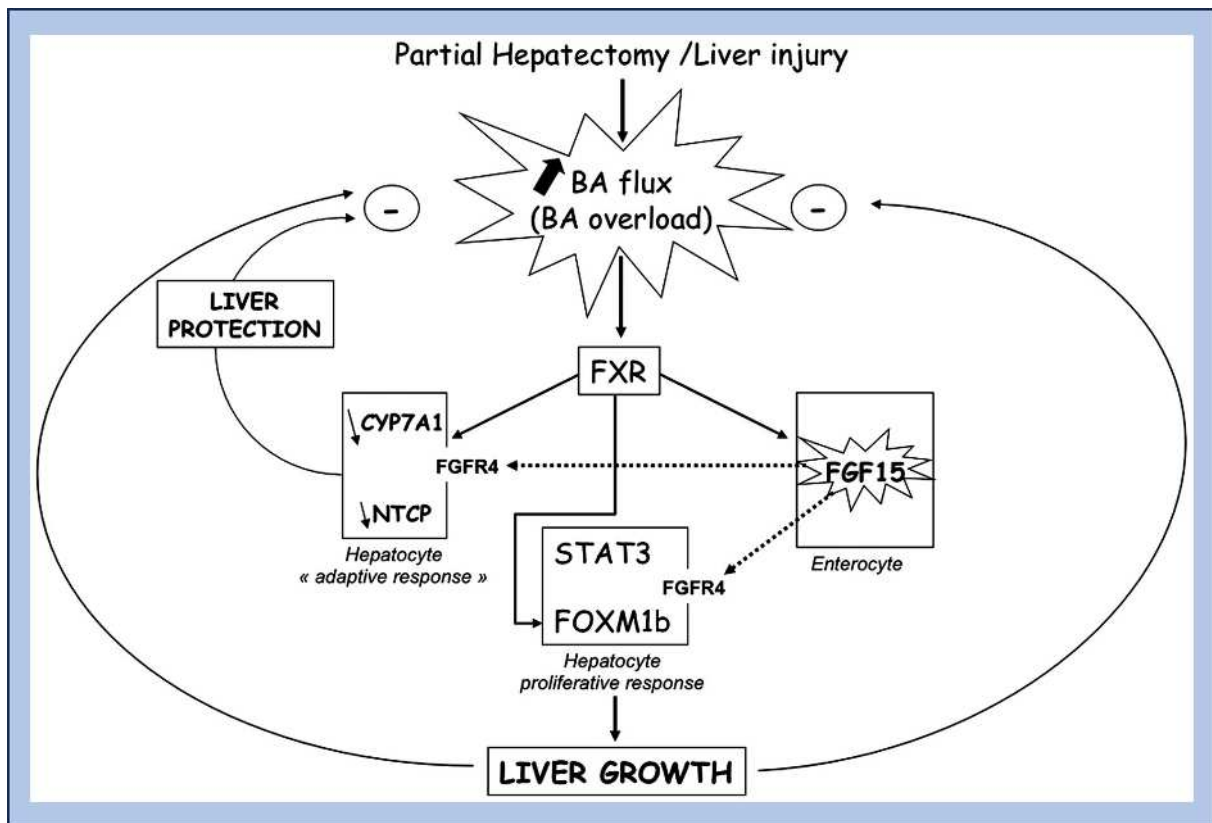


Figure 8 : Représentation schématique de l'implication des acides biliaires dans la régénération hépatique

Après une hépatectomie partielle ou une lésion hépatique, le flux des acides biliaires est augmenté et une surcharge en acides biliaires se produit au niveau hépatique. L'activation de FXR par les acides biliaires conduit à des réponses adaptatives dans l'hépatocyte : la synthèse (CYP7A1) et l'entrée (NTCP) des acides biliaires sont diminuées, tandis que l'exportation des acides biliaires (BSEP, OST α/β) est augmentée. FXR active également la prolifération des hépatocytes via le facteur de transcription FoxM1b. Dans l'entérocyte, l'induction du FGF15 dépendant de FXR contribue à la réponse adaptative des hépatocytes (inhibition de la synthèse des acides biliaires) et stimule la prolifération des hépatocytes via l'axe FGFR4-Stat3-FoxM1b. (D'après Gilgenkrantz et Tordjmann, 2015).

1.6) La réaction ductulaire

La réaction ductulaire est caractérisée par la prolifération de voies biliaires réactives induites en cas de lésions hépatiques. La réaction ductulaire est pathologiquement reconnue comme une hyperplasie des voies biliaires et est couramment observée quand les voies biliaires sont endommagées. Elle peut également être identifiée dans divers troubles hépatiques, y compris la stéatohépatie métabolique (Sato et al., 2019). La réaction ductulaire s'accompagne d'interactions majeures entre cellules ductulaires

et cellules mésenchymateuses péri-ductulaires qui produisent des ligands de *hedghog* et stimulent ainsi mutuellement leur viabilité et prolifération, ce qui amplifie la réaction ductulaire et la fibrogenèse, comme déjà démontré dans un modèle murin après ligature de la voie biliaire principale (Omenetti et al., 2007). En effet, la réaction ductulaire n'est pas décrite comme une prolifération canalaire car ce phénomène englobe une réaction associée à d'autres tissus ou cellules hépatiques, tels que le stroma, les cellules inflammatoires et les cellules infiltrées dans le foie, y compris les macrophages dérivés de la moelle osseuse (Roskams et al., 2004). La réaction ductulaire est souvent associée, non seulement à la prolifération des voies biliaires, mais également à d'autres réactions hépatiques, telles que l'infiltration de cellules inflammatoires dans les zones portales (Gadd et al., 2014) (**Figure 9**). Les cellules progénitrices hépatiques (HPC) sont activées dans des atteintes hépatiques chroniques. La réaction ductulaire est associée à une fibrose et à des dommages hépatiques. En effet, les cellules ductulaires expriment des facteurs pro-fibrogéniques comme le TGF β ou le PDGF (*platelet-derived growth factor*), qui stimulent le recrutement et l'activation de myofibroblastes (Kinnmam et al., 2003). Les canaux biliaires sont systématiquement entourés de micro-vaisseaux, et le nombre de canaux correspond à la densité des micro-vaisseaux qui les accompagnent, indiquant une relation étroite entre la réaction ductulaire et les micro-vaisseaux ainsi que l'angiogenèse (Gouw et al., 2006). Les myofibroblastes semblent être critiques dans l'angiogenèse pathologique, qui se produit dans la fibrose hépatique avancée. Alors que l'association entre l'angiogenèse et la fibrose au cours de la progression des maladies hépatiques n'est pas complètement élucidée, il a été proposé que les myofibroblastes producteurs de collagène de type XV- α 1 pourraient fournir un lien important, à la fois en stabilisant les nouveaux vaisseaux formés, et en formant un *scaffolding* pour le dépôt de collagène interstitiel (Lemoine et al., 2015 ; Lemoine et al., 2016).

Par conséquent, même lorsque la réaction ductulaire est identifiée dans diverses affections hépatiques comme une hyperplasie des voies biliaires, les mécanismes, les cellules/tissus associés et les réactions dans la réaction ductulaire peuvent différer selon la pathologie hépatique sous-jacente. La réaction ductulaire suscite un intérêt scientifique important car elle est associée à la transdifférenciation des cellules hépatiques et peut jouer un rôle important dans la régénération hépatique. Les cellules activées au cours de la réaction ductulaire peuvent être des cholangiocytes, des

hépatocytes ou des HPC (**Figure 9**). Bien que d'autres études soient nécessaires pour élucider les mécanismes détaillés et les rôles fonctionnels dans maladies du foie, la réaction ductulaire peut représenter une cible thérapeutique pour inhiber la fibrose hépatique et favoriser la régénération hépatique en cas d'hépatopathie chronique (Sato et al., 2019, Ko et al., 2020).

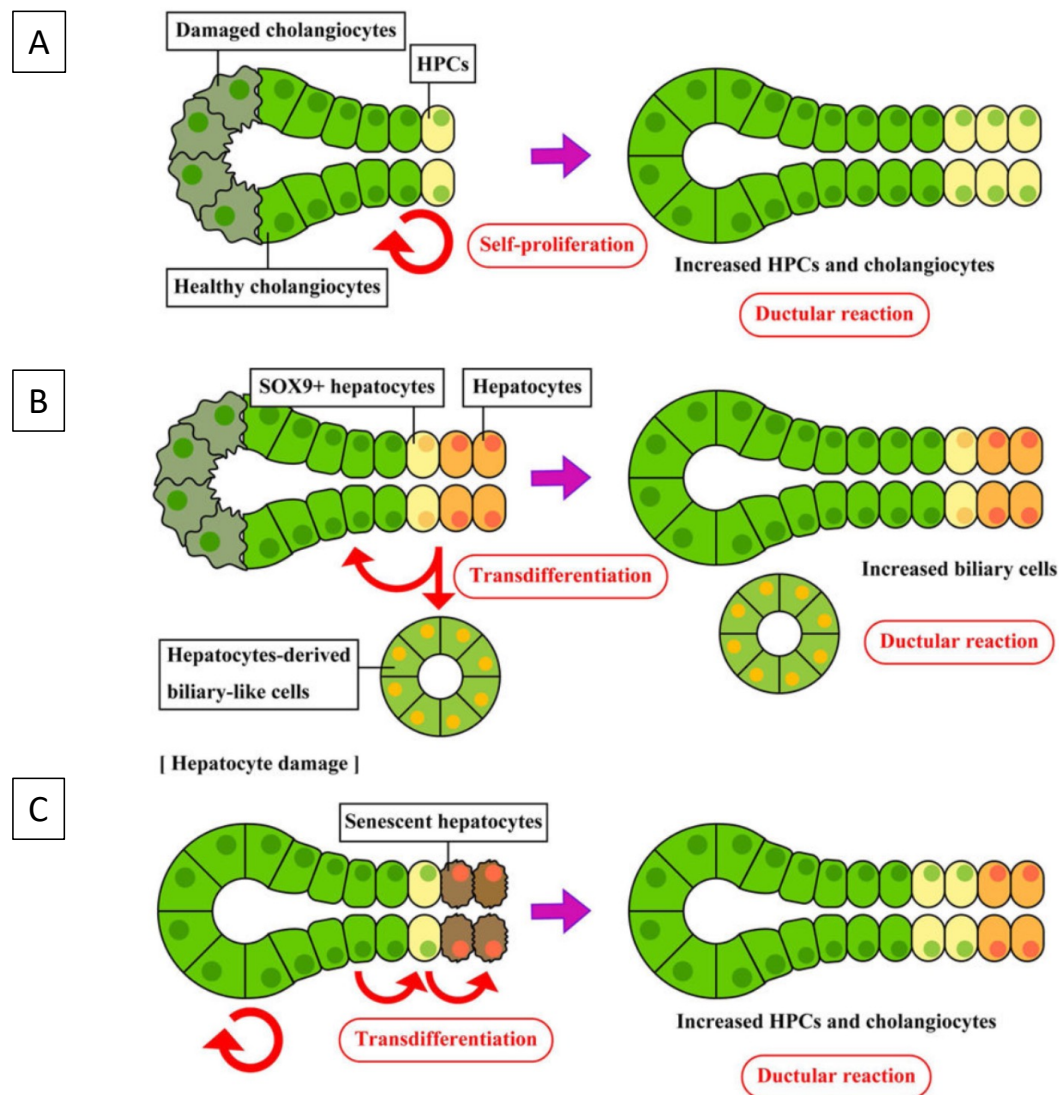


Figure 9 : Différents types de réaction ductulaire

La réaction ductulaire est caractérisée par la prolifération de voies biliaires réactives induites en cas de lésions hépatiques. Les mécanismes dans la réaction ductulaire peuvent différer selon la pathologie hépatique sous-jacente. Lors de lésions cholangiocytaires : **A**. Les cholangiocytes et/ou les cellules progénitrices hépatiques (HPC) prolifèrent pour compenser l'altération de la fonction des cellules biliaires. **B**. Les hépatocytes se trans-différencient en cholangiocytes et/ou en cellules de type biliaire. **C**. Lors de lésions hépatocytaires, les cholangiocytes commencent à proliférer et se trans-différencient en hépatocytes via les HPC. (D'après Sato et al., 2019).

Chapitre 1 : les points importants

1. Le foie est un organe complexe jouant un rôle central dans le contrôle du métabolisme.
2. Les acides biliaires jouent un rôle crucial dans l'homéostasie du foie et dans la régénération hépatique.
3. Lors d'une atteinte hépatique chronique les cellules progénitrices prolifèrent et se différencient en hépatocytes fonctionnels (réaction ductulaire).

Chapitre 2 : Introduction à la O-GlcNAcylation

2.1) O-GlcNAcylation

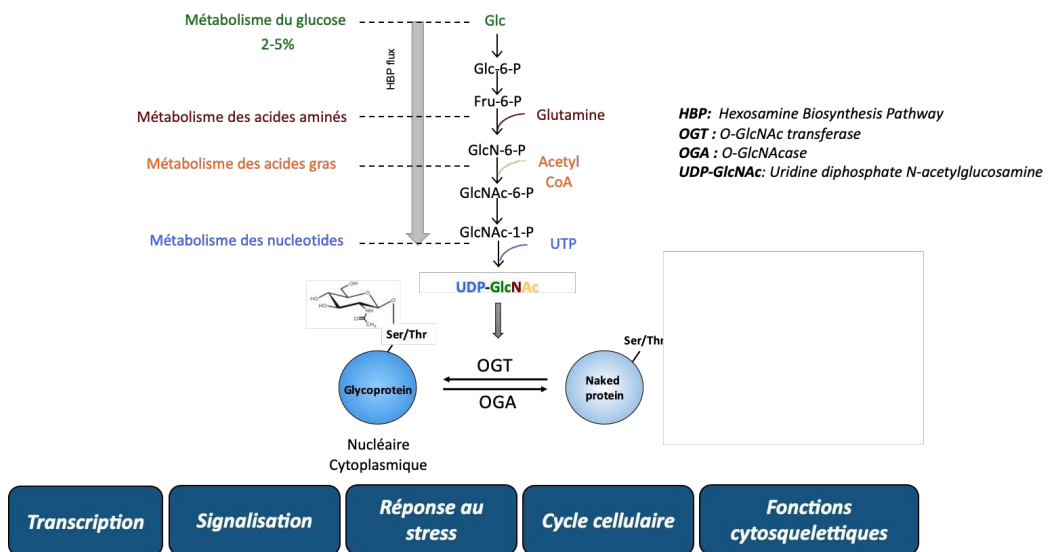
La O-GlcNAcylation est une modification post-traductionnelle où une seule molécule de GlcNAc est β -O-liée aux acides aminés sérine (Ser) et thréonine (Thr) sur les protéines nucléaires, cytoplasmiques et mitochondriaux (Hart et al, 2007, Hart et al., 2011).

La O-GlcNAcylation (O-GlcNAc) a été découverte en 1984 par Torres et Hart. Ils ont utilisé la galactosyltransférase de lait bovin et l'UDP (uridine-5'-diphosphogaalectose tritiée) pour sonder la surface cellulaire du système immunitaire murin avec de fragments O-GlcNAc terminaux (Torres et Hart, 1984). La plupart de ces fractions étaient enrichies dans le noyau et dans le cytoplasme (Holt et Hart, 1986).

La O-GlcNAcylation est contrôlée uniquement par deux enzymes : la O-GlcNAc transférase (OGT) qui lie les molécules GlcNAc du métabolite UDP-GlcNAc aux résidus Ser/Thr des protéines cibles et la O-GlcNAcase (OGA) qui a l'activité opposée d'hydrolyse les molécules GlcNAc (**Figure 10A**). Ces deux enzymes interviennent dans le cycle dynamique de la O-GlcNAcylation sur une grande variété de protéines cytosoliques, nucléaires et mitochondriales. Il a été proposé que la O-GlcNAcylation fonctionne comme un senseur de nutriments et de stress régulant plusieurs processus cellulaires allant de la transcription à la traduction, de la transduction du signal au control métabolique (Nie et al., 2019).

Il a été montré qu'au niveau cellulaire, une régulation compensatrice de l'expression de l'OGT et de l'OGA est nécessaire pour assurer les niveaux basaux d'O-GlcNAcylation et que la régulation de l'OGT semble se produire principalement par modification post-transcriptionnelle alors que la régulation de l'OGA est principalement transcriptionnelle (Decourcelle et al., 2020). Étant donné que l'O-GlcNAcylation joue un rôle très important dans la régulation des processus cellulaires en réponse aux signaux nutritionnels et hormonaux, le maintien de l'homéostasie de la O-GlcNAcylation est essentiel pour une fonction cellulaire optimale (**Figure 10B**). En effet, la perturbation de l'homéostasie de la O-GlcNAcylation a été impliquée dans la pathogenèse d'une multitude de maladies humaines (Yang et Qian, 2017).

A



B

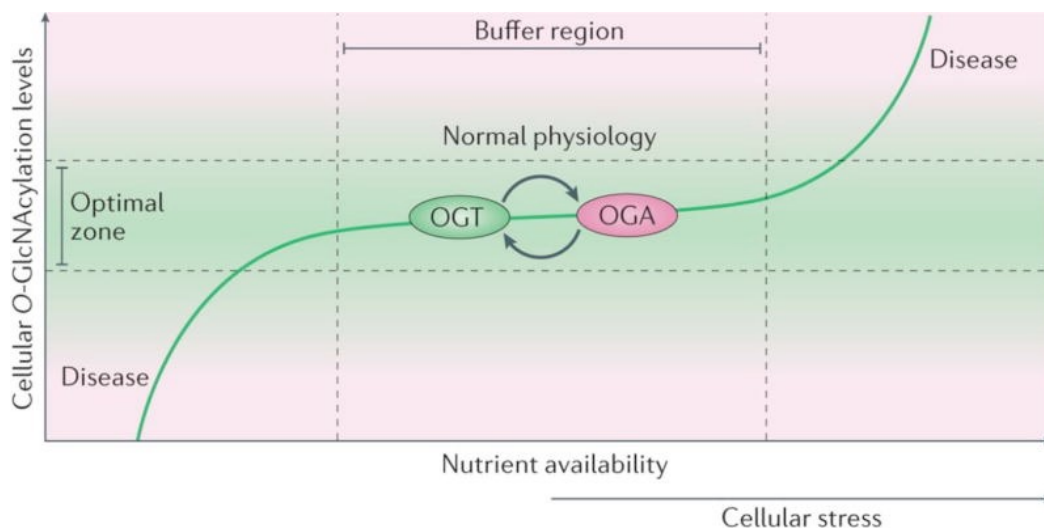


Figure 10 : Schéma représentatif et homéostasie de la O-GlcNAcylation

A. L'OGT modifie les protéines en rajoutant une molécule de GlcNAc du métabolite UDP-GlcNAc aux résidus Ser/Thr des protéines cibles. L'OGA catalyse la réaction opposée. HBP: Hexosamine Biosynthesis Pathway, UDP-GlcNAc: Uridine diphosphate N-Acetylglucosamine (D'après Hart, 2019).

B. Le maintien de l'homéostasie de la O-GlcNAcylation est essentiel pour une fonction cellulaire optimale et la perturbation de l'homéostasie de la O-GlcNAcylation a été impliquée dans la pathogenèse d'une multitude de maladies humaines (D'après Yang et Qian, 2017).

L'UDP-GlcNAc (uridine-diphosphate-N-Acetylglucosamine), le substrat de l'OGT, est produit *via* l'activation de la voie de biosynthèse des hexosamines (HBP). La première étape limitante de la voie des HBP est contrôlée par l'enzyme fructose-6-phosphate

aminotransférase (GFAT) qui catalyse le transfert d'un groupe aminé de la glutamine sur le fructose-6-phosphate (fructose-6P), générant ainsi de la glucosamine-6-phosphate (glucosamine-6P) (**Figure 11**). La voie des HBP est souvent appelée voie de la "détection des nutriments" car elle utilise du glucose, de la glutamine et/ou de la glucosamine, une source d'acétyl-CoA, comme des acides gras ainsi qu'un nucléotide riche en énergie (UTP) pour la synthèse d'UDP-GlcNAc.

De plus, la O-GlcNAcylation régule des effecteurs clés de la signalisation de l'insuline, de la gluconéogenèse, de la lipogenèse, de la biosynthèse du glycogène et de la fonction mitochondriale (Bond et Hanover, 2015 ; Hart, 2019, Akella et al., 2019), soulignant l'importance de cette voie en en tant que senseur de nutriments.

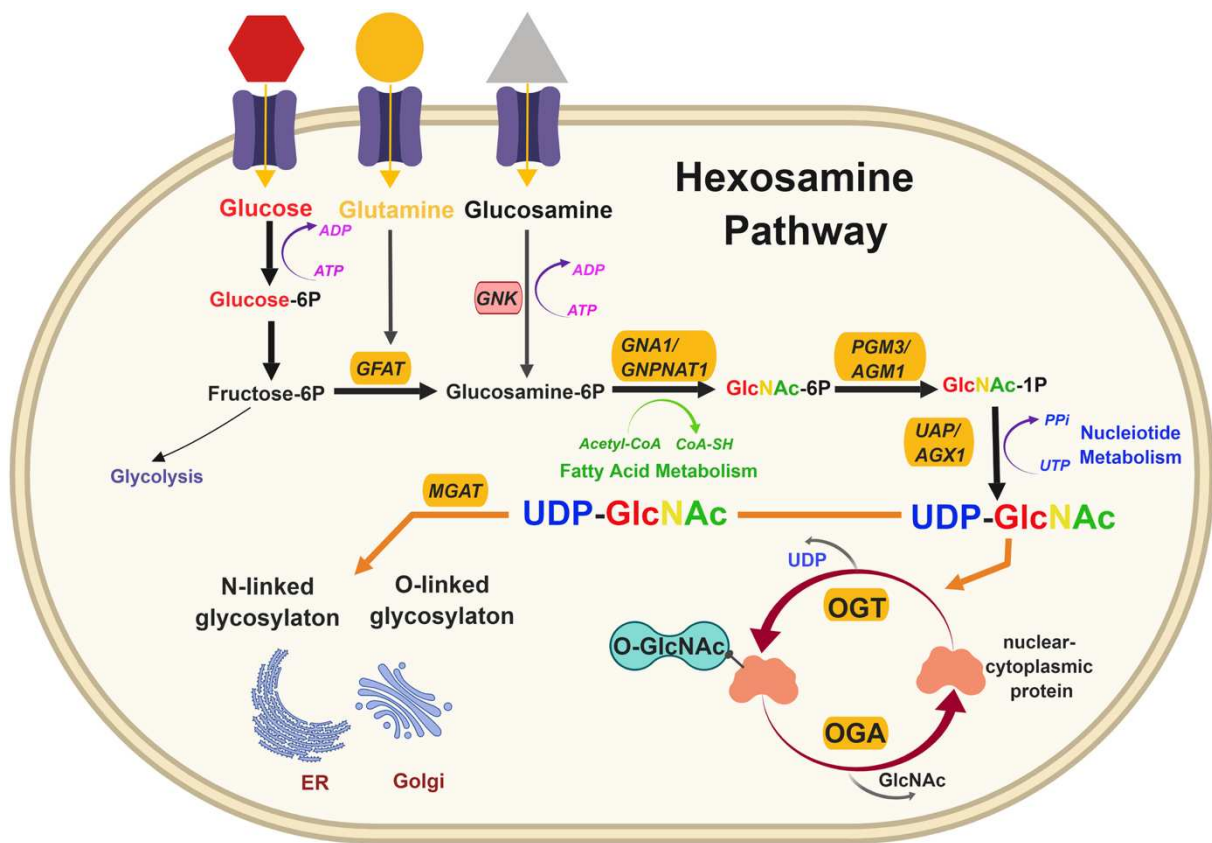


Figure 11: La voie des hexosamines

Le glucose entre dans la cellule et subit une conversion en deux étapes en fructose-6P (fructose-6-phosphate), dont environ 95 % est métabolisé par la glycolyse et de 3 à 5 % est converti en glucosamine-6P (glucosamine-6-phosphate) par l'enzyme GFAT (glutamine : fructose-6-phosphate aminotransférase) en utilisant la glutamine qui entre dans la cellule via un transporteur membranaire. Le GFAT catalyse l'étape limitante et donc régulatrice de la voie des HBP. La GNA1/GNPAT1 (glucosamine-6-phosphate N-acétyltransférase) convertit ensuite la glucosamine-6P (qui peut également être produite à partir de la glucosamine entrant

dans la cellule) en GlcNAc-6P (N-acétylglucosamine-6-phosphate), en utilisant l'acétyl-CoA obtenu via le métabolisme des acides gras. Celui-ci est ensuite converti en GlcNAc-1P (N-acétylglucosamine 1-phosphate) par l'enzyme PGM3/AGM1 (Phosphoacetylglucosamine mutase) et ensuite en UDP-GlcNAc (uridine diphosphate N-Acétylglucosamine) par l'enzyme UAP/AGX1 (UDP-N -Acétylhexosamine pyro-phosphorylase), en utilisant de l'UTP provenant du métabolisme des nucléotides. L'UDP-GlcNAc est ensuite utilisée pour la glycosylation dans le réticulum endoplasmique et le Golgi et pour la O-GlcNAcylation des protéines nucléaires, mitochondriales et cytoplasmiques par l'OGT. L'OGA catalyse l'élimination de l'O-GlcNAc et rajoute du GlcNAc au pool de l'HBP pour le recyclage via la voie de récupération (D'après Akella et al., 2019).

2.2) La O-GlcNAc transférase (OGT)

La O-GlcNAc transférase ou OGT est une protéine codée par un gène localisé dans la région Xq13.1 du chromosome X humain et la région entre les marqueurs DXMit41 et DXMit95 dans le chromosome X de la souris (Shafi et al., 2000). L'*Ogt* est un gène très conservé chez les eucaryotes et présente une forte homologie chez les vertébrés. Il est formé par 23 exons et 21 introns et il a été décrit contenir deux promoteurs alternatifs, illustrés sur la **Figure 12A** (Hanover et al., 2003).

Le quatrième intron de l'*Ogt*, normalement épissé pour produire un transcrit, peut également être utilisé comme "exon 5", produisant un transcrit, décrit comme étant l'isoforme mitochondriale de l'OGT (Love et al., 2003).

2.2a) La O-GlcNAc transférase (OGT) et ses différentes isoformes

L'isoforme humaine de l'OGT contient 1 036 acides aminés, correspondant à un poids moléculaire de 110 KDa. Le gène *Ogt* code pour trois codons d'initiation différents : la forme nucléocytoplasmique (ncOGT, 110 KDa), l'isoforme mitochondriale (mOGT, 103 KDa) et une isoforme courte (sOGT, 70 KDa). La région carboxy-terminale est commune à toutes les isoformes et comprend le domaine catalytique, divisé en trois parties (N-Cat, Int-D et C-Cat) et un domaine de liaison aux phosphoinositides (PPO, *PIP-binding domain of OGT*). Cependant, la région N-terminale de la protéine diffère par le nombre de répétitions tétratricopeptidiques (TPR), qui interviennent dans l'interaction avec les substrats (Iyer et Hart, 2003), avec 13,5 répétitions dans le ncOGT, 9 répétitions dans le mOGT et 2,5 répétitions dans le sOGT (Jinek et al., 2004)

(Figure 13A). Les isoformes de l'OGT ont une localisation subcellulaire différente ; l'isoforme ncOGT est localisée dans le cytoplasme et le noyau, l'isoforme sOGT est principalement localisée dans le cytoplasme, tandis que l'isoforme mOGT est localisée en grande partie dans les mitochondries (Kreppel, Blomberg and Hart, 1997 ; Lubas et al., 1997 ; Hanover et al., 2003 ; Love et al., 2003).

Une étude publiée en 2016 a rapporté de faibles niveaux d'expression de l'isoforme mOGT dans plusieurs lignées cellulaires humaines et son absence dans les tissus de souris alors que des niveaux élevés de ncOGT étaient suffisants pour augmenter la O-GlcNAcylation des protéines mitochondriales, suggérant une fonction non essentielle de mOGT ou une redondance entre ces deux isoformes (Trapannone et al., 2016).

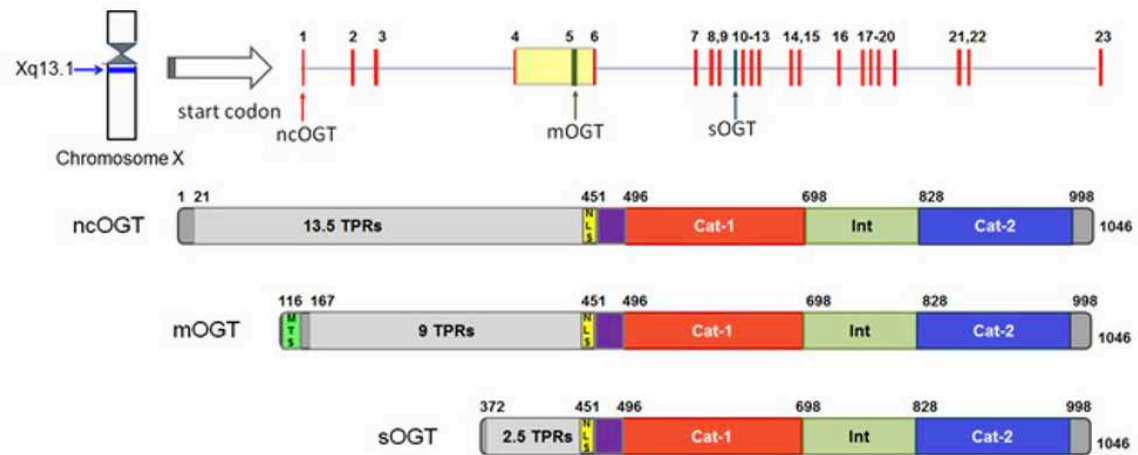
Un aperçu structural de l'architecture de l'OGT a été décrite pour la première fois en 2004 par l'étude de Jinek *et al.* qui a obtenu la structure cristalline du domaine TPR humain. Les TPR créent une structure hélicoïdale qui permet l'interaction OGT-protéine *via* des résidus d'asparagine (Asn), indépendants de la séquence d'acides aminés du polypeptide cible (Jinek et al., 2004). Cependant, ce n'est qu'en 2011, que Lazarus *et al.* ont identifié la structure cristalline de la liaison de l'OGT humain à un substrat peptidique et à l'UDP et les auteurs ont proposé une structure modèle pour l'OGT (**Figure 12B**). Ce modèle 3D pour l'OGT a permis aux auteurs de définir plusieurs mutants de l'OGT avec une activité fortement réduite tels que le H498A et le H558A, situés tous les deux dans le domaine N-Cat, qui est impliqué dans l'interaction avec les peptides cibles (Lazarus et al., 2011).

Alors que de nombreuses protéines ont été décrites comme étant modifiées par l'OGT, une séquence consensus bien définie pour le substrat de l'OGT fait défaut. L'un des défis majeurs de la biologie moléculaire est d'identifier le code complet des modifications post-traductionnelles. Le modèle Yin-Yang (cf paragraphe 2.4a) entre phosphorylation et O-GlcNAcylation suggère que la O-GlcNAcylation et la phosphorylation contrôlent les fonctions des protéines, au moins en partie, en se faisant concurrence sur des sites donnés (Wells, Vosseller and Hart, 2001).

Sur la base de cette hypothèse, Leney et ses collègues ont utilisé la spectrométrie de masse pour identifier une séquence fréquente et spécifique d'interaction phosphorylation/O-GlcNAcylation, (pS/pT)P(V/A/T)(gS/gT) (Leney et al., 2017). L'année suivante, un autre groupe a publié une séquence OGT humaine préférentielle

définie comme [TP][PT][VT]S/T[RLV][ASY], utilisant une bibliothèque de peptides pour cribler les substrats (Pathak et al., 2015). Cependant, la tentative de développer des méthodes de calcul pour prédire les sites de O-GlcNAcylation n'a toujours pas été satisfaisante en raison de l'ambiguïté des sites de reconnaissance (Wang et al., 2011 ; Jia, Liu et Wang, 2013 ; Kao et al., 2015 ; Jia, Zuo et Zou, 2018).

A.



B.

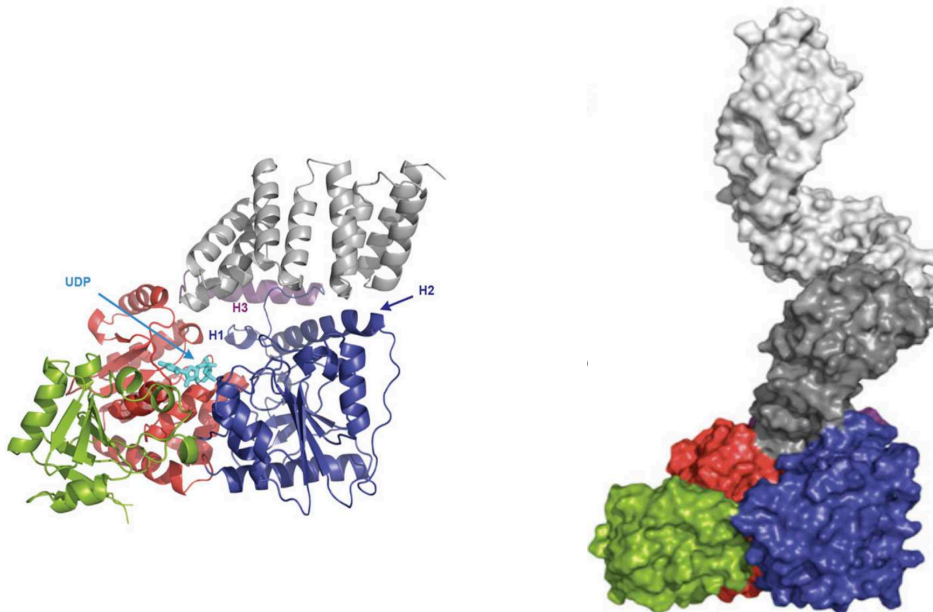


Figure 12 : Structures du gène et de la protéine OGT

A. Structure génomique des variants d'épissage de l'isoforme humaine de l'OGT (en haut) et architecture schématique des domaines des isoformes de l'OGT (en bas). Les TPR sont représentés en gris clair, la séquence de localisation nucléaire (NLS) est en jaune, les régions catalytiques de la glycosyltransférase sont en rouge (Cat-1) et en bleu (Cat-2) (D'après Ju Kim, 2020).

B. Structure cristalline de la liaison de l'OGT au métabolite UDP (D'après Lazarus et al., 2011).

Enfin, une nouvelle séquence importante dans l'ARNm de l'*Ogt* appelée *intronic splicing silencer* (ISS) a été décrite. Localisée entre les exons 4 et 5, cette séquence pourrait réguler dynamiquement l'expression de l'*Ogt* en fonction des niveaux de O-GlcNAcylation cellulaire. Il a été proposé que l'*Ogt* contenant la séquence ISS pourrait fonctionner comme un réservoir nucléaire de pré-ARNm pouvant être rapidement épissé pour produire de l'ARNm *Ogt* entièrement épissé (**Figure 13**) (Park et al., 2017). En effet, Tan *et al.* ont validé cette hypothèse et ils ont suggéré, en utilisant des données RNA-seq (*RNA sequencing*) de différents types cellulaires, que la O-GlcNAcylation elle-même pourrait être un régulateur majeur de l'épissage ISS (Tan et al., 2020). Cependant, les auteurs n'ont pas été en mesure d'identifier si cet effet est dû à la O-GlcNAcylation de différentes protéines impliquées dans la régulation de l'épissage des introns ou si le facteur modifié est impliqué dans la modification de la chromatine, le remodelage des nucléosomes ou toute autre machinerie transcriptionnelle connue pour être modulée par l'OGT (Tan et al., 2020).

De plus, l'OGT est soumise à une régulation par les microARN (Liu et al., 2017) et peut aussi réguler la production de micro-ARN par la O-GlcNAcylation des facteurs de transcription (Love et al., 2010 ; Pepe et al., 2017) (**Figure 16**). Enfin les enzymes du cycle de la O-GlcNAcylation sont également régulées réciproquement ; les diminutions de l'activité OGT peuvent influencer les niveaux d'OGA, par le biais de mécanismes pas totalement élucidés (Park et al., 2017).

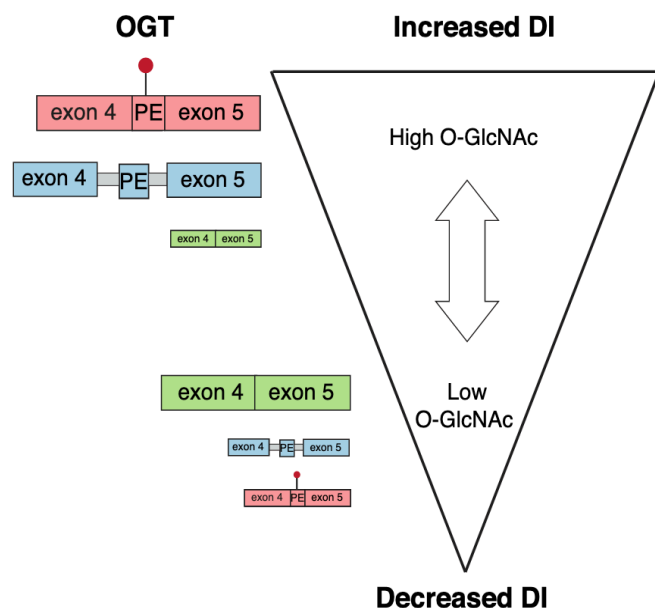


Figure 13 : Régulation de l'intronic splicing silencer (ISS) de l'Ogt

Dans des conditions physiologiques, les cellules produisent de l'ARNm de l'Ogt contenant le domaine ISS, suggéré pour agir comme réservoir pour une réponse rapide aux changements des niveaux cellulaires d'O-GlcNAcylation. De faibles niveaux de protéines O-GlcNAcylées activent l'épissage complet de l'ARNm de l'Ogt pour l'expression des protéines. En revanche, des niveaux élevés d'O-GlcNAcylation activent la rétention de l'ISS nucléaire. DI : detained intron. (Adaptée de Tan et al., 2020.)

2.2b) Régulation de l'activité de l'OGT via phosphorylation

L'OGT peut être modifiée par plusieurs modifications post-traductionnelles, notamment la phosphorylation, la O-GlcNAcylation (Lubas et Hanover, 2000), l'acétylation (Lundby et al., 2012), l'ubiquitination (Wagner et al., 2011) et la sumoylation (Lumpkin et al., 2017). Les modifications post-traductionnelles de l'OGT semblent dépendre de l'interaction protéine-protéine à travers la région TPR (Kreppel, Blomberg et Hart, 1997; Kreppel et Hart, 1999).

En cas de stress cellulaire ou de réduction de la disponibilité en nutriments intracellulaires, la protéine kinase activée par l'AMP (AMPK) agit comme un senseur pour maintenir les niveaux d'énergie cellulaire (Foretz, Even et Viollet, 2018). Lors de l'activation *in vitro* des myotubes différenciés, l'AMPK phosphoryle l'OGT sur la

Thr444, entraînant sa localisation nucléaire et l'induction de la O-GlcNAcylation nucléaire (Bullen et al., 2014). Lorsque l'OGT est phosphorylée sur la Thr444, elle présente alors une forte activité de O-GlcNAcylation de l'AMPK, ce qui potentialise davantage l'activité de cette dernière (Bullen et al., 2014). L'inhibition de la O-GlcNAcylation *via* des stimuli pharmacologiques abolit l'activation de l'AMPK (Bullen et al., 2014). Ces résultats révèlent une interaction importante entre l'OGT et l'AMPK qui participent de manière synergique à la régulation du métabolisme cellulaire.

De plus, la CaMKII (protéine kinase II dépendante du calcium/calmoduline), une kinase qui phosphoryle l'AMPK, phosphoryle également l'OGT sur la Ser20, induisant son activation, et stimulant l'autophagie et l'adaptation métabolique au jeûne (Ruan et al., 2017). Le résidu Ser20 de l'OGT est également phosphorylé par la protéine Chk1 (Checkpoint kinase I) dans les cellules HeLa, stabilisant l'OGT nécessaire à la cytokinèse (Li et al., 2017). La protéine GSK3 β (glycogène synthase Kinase 3 β), constitutionnellement active et inhibée *via* l'activation des voies de signalisation Wnt et insuline, phosphoryle également l'OGT sur les Ser3 et Ser4 dans le cerveau de souris. Bien que les auteurs suggèrent que d'autres sites de phosphorylation pourraient être nécessaires pour l'activation complète de l'OGT par GSK3 β , la phosphorylation sur les Ser3 et Ser4 augmente son activité (Kaasik et al., 2013) (**Figure 14**).

L'extrémité C-terminale de l'OGT peut également être la cible des modifications post-traductionnelles. En effet, en réponse à l'insuline dans les adipocytes, l'activation du récepteur de l'insuline (IR) permet la phosphorylation de l'OGT au niveau de la Tyrosine 976 (Tyr976), ce qui stimule son activité (Kreppel, Blomberg et Hart, 1997 ; Whelan, Lane et Hart, 2008).

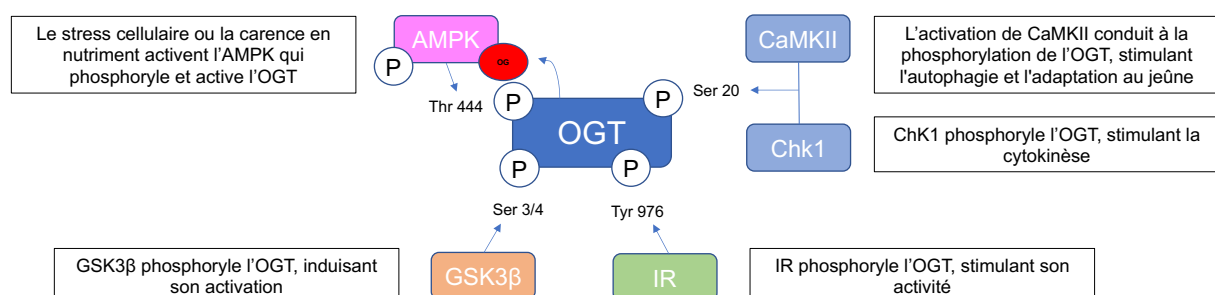


Figure 14 : Régulation de l'OGT via phosphorylation

En condition de stress cellulaire ou de carence en nutriments, l'AMPK est activée par phosphorylation conduisant à la phosphorylation de l'OGT sur le résidu Thr444 provoquant une rétroaction positive où l'OGT modifie et potentialise l'activité de l'AMPK. CaMKII phosphoryle l'OGT sur la Ser20 stimulant l'autophagie et l'adaptation au jeûne. Le même résidu est modifié par Chk1 provoquant l'activation de la cytokinèse. Le récepteur de l'insuline (IR) stimule l'activité de l'OGT via la phosphorylation sur Tyr976 et la GSK3 β active l'OGT en phosphorylant la Ser3 et/ou la Ser4.

2.3) O-GlcNAcase (OGA)

La O-GlcNAcase ou OGA est l'enzyme opposée à l'OGT, dont le rôle principal est l'hydrolyse du résidu O-GlcNAc des protéines cibles de l'OGT. La protéine est codée par un seul gène de 16 exons, situé en position 10q24.32 du génome humain (Heckel et al., 1998).

2.3a) La O-GlcNAcase (OGA) et ses différentes isoformes

L'OGA est une protéine de 916 acides aminés présente sous deux isoformes chez les vertébrés : une forme complète et une forme courte (Comtesse, Maldener et Meese, 2001). La forme complète (OGA-L, 120-130 KDa) est localisée principalement dans le cytoplasme et le noyau (Gao et al., 2001 ; Wells et al., 2002 ; Toleman et al., 2004), la forme courte (OGA-S, 75 KDa) a été initialement localisée dans le noyau (Comtesse, Maldener et Meese, 2001) puis au niveau de la surface des gouttelettes lipidiques (Keembiyehetty et al., 2011). Cependant, des résultats récents de notre équipe ont montré que la forme courte OGA-S est préférentiellement localisée dans la mitochondrie (Pagesy et al., 2022).

La structure de l'OGA-L comporte un domaine catalytique N-terminal, un domaine désordonné, contenant un site de clivage par la caspase-3 au niveau du résidu 413 (Butkinaree et al., 2008), un domaine Stalk et un domaine C-terminal de type HAT (*histone acetyltransferase*). La forme courte est dépourvue du domaine de type HAT mais contient 15 acides aminés uniques dérivés d'un épissage incomplet de l'intron 10 (Macauley et Vocadlo, 2009). La contribution relative des isoformes de l'OGA *in vivo* n'est toujours pas claire (**Figure 15**).

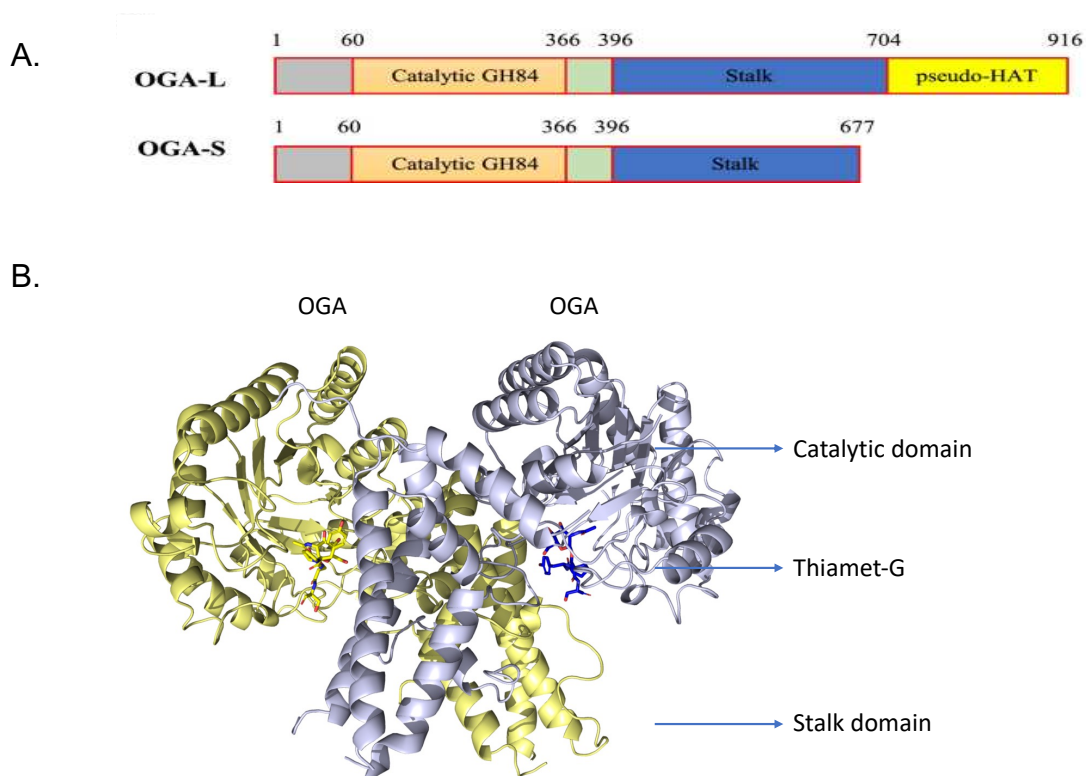


Figure 15 : Structure de la protéine O-GlcNAcase (OGA)

A. L'OGA complète (OGA-L) contient dans l'extrémité N le domaine catalytique d'hydrolyse O-GlcNAc, un domaine hélicoïdal désordonné, un domaine Stalk et un domaine HAT-like fonctionnellement inconnu dans l'extrémité C terminale. L'isoforme OGA-S ne possède pas le domaine HAT et contient un peptide unique de 15 acides aminés (adaptée de Lu et al., 2022).

B. Structure cristalline de l'OGA ayant lié le Thiamet-G (TMG) sur son site actif (D'après Li B et al., 2017).

Trois groupes indépendants ont décrit la structure cristalline de l'isoforme humaine de l'OGA révélant sa reconnaissance de substrat et sa fonction (Li et al., 2017 ; Elsen et al., 2017 ; Roth et al., 2017). Les auteurs ont décrit que l'OGA agit comme un homodimère où le site actif est situé entre le domaine catalytique d'un monomère et le faisceau hélicoïdal C-terminal du second monomère (Roth et al., 2017). Li et ses collègues ont co-cristallisé l'OGA avec le Thiamet-G (TMG), un puissant inhibiteur de l'OGA généralement utilisé dans « le monde de la O-GlcNAcylation » pour étudier les conséquences de l'augmentation des niveaux d'O-GlcNAcylation (Li et al., 2017) (**Figure 15**). Cependant, la séquence peptidique spécifique reconnue par OGA,

comme c'est le cas pour OGT, reste un défi en raison de la large gamme de protéines modulées par la O-GlcNAcylation.

2.3b) Régulation de l'activité de l'OGA via des modifications post-traductionnelles

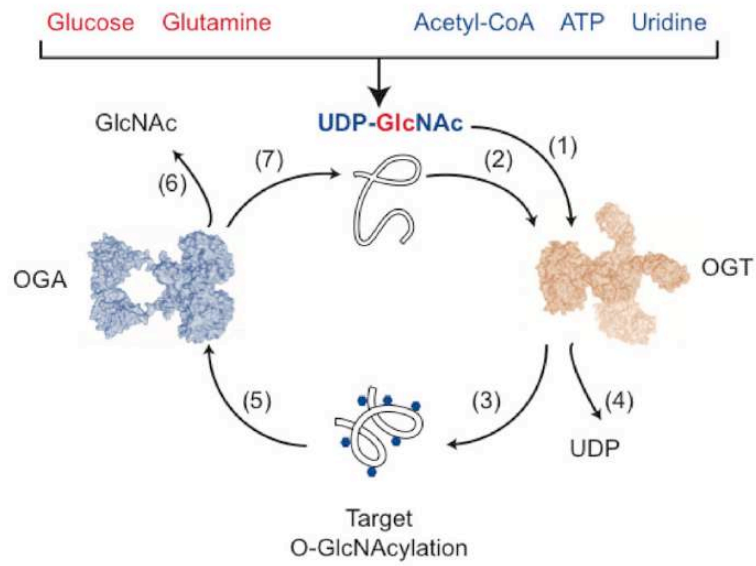
Comme mentionné précédemment, la régulation de l'équilibre entre OGT et OGA est un processus complexe et dynamique dans lequel un mécanisme compensatoire est déclenché par des changements dans les niveaux cellulaires de la O-GlcNAcylation. De manière intéressante, l'OGA peut être aussi la cible directe de l'OGT (Whisenhunt et al., 2006). Il a été démontré que le résidu Ser405 de l'OGA, très conservé chez les vertébrés, est O-GlcNAcylé et que celle-ci diminue sa stabilité (Gorelik et al., 2019).

Il a été suggéré que l'OGA serait également modifiée par phosphorylation, acétylation et ubiquitination sur plusieurs résidus (Hornbeck et al., 2015). Certains de ces sites ayant été identifiés par spectrométrie de masse, leur pertinence fonctionnelle doit être évaluée par des approches telles que la mutagenèse dirigée.

Enfin il a été décrit que les microARN régulent le niveaux et l'activité de l'OGA (Hanover et al., 2018) (**Figure 16**).

Glycolytic enzymes Kinases Transcription factors Mitochondrial proteins

A



Glycolytic enzymes Kinases Transcription factors Mitochondrial proteins

B

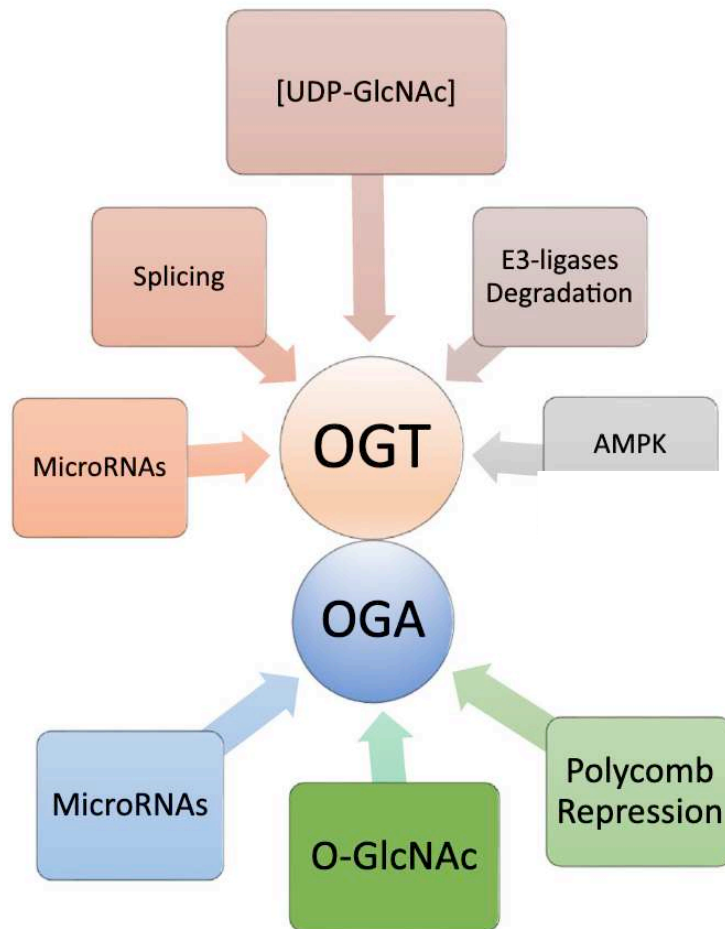


Figure 16 : Régulation de l'OGT et de l'OGA.

A. La voie de biosynthèse des hexosamines (HBP) est alimentée par des nutriments (glucose et glutamine) et des métabolites (acétyl-CoA, uridine et ATP). Les concentrations de ces précurseurs entraînent la production d'UDP-GlcNAc intracellulaire. De cette manière, l'OGT agit comme un détecteur des niveaux d'UDP-GlcNAc qui se lie à l'OGT avec une haute affinité (étape 1) avant la reconnaissance des polypeptides cibles (étape 2). La réaction catalysée par la O-GlcNAc transférase (OGT) implique une participation active de l'UDP-GlcNAc dans la catalyse avec la libération du peptide glycosylé (étape 3) et d'UDP (étape 4). Les peptides O-GlcNAcylés sont ensuite reconnus par l'OGA (étape 5) et sélectivement déglycosylés (étape 6) avec libération du peptide non modifié (étape 7) complétant le cycle. Les cibles sont les enzymes glycolytiques, les kinases, les facteurs de transcription et les protéines mitochondriales, comme indiqué sur la figure.

B. Régulation étroite et interdépendante des enzymes du cycle de la O-GlcNAc. L'OGT et l'OGA sont contrôlées par des mécanismes redondants de régulations. Pour l'OGT, cela inclut les microARN, la rétention d'intron dans l'ARN du gène OGT et la régulation par l'AMPK. De plus, la stabilité de l'OGT est régulée par la dégradation médiée par la E3-ligase. Pour l'OGA, les microARN et la modification post-traductionnelle par l'OGT régulent ses niveaux et ses activités (Adaptée de Hanover et al., 2018)

2.4) Dialogue entre la O-GlcNAcylation et les autres modifications post-traductionnelles

Les modifications post-traductionnelles se produisent dans presque toutes les protéines et la façon dont ces modifications se combinent pour générer des effets biologiques complexes commence seulement à être comprise (Lothrop, Torres et Fuchs, 2013 ; Yang et Qian, 2017).

2.4a) Interaction avec la phosphorylation

La O-GlcNAcylation est souvent comparée à la phosphorylation puisqu'il s'agit d'un processus réversible et dynamique se produisant sur des résidus Ser et Thr sur les protéines cibles. Cependant, contrairement à la phosphorylation induite par des centaines de phosphatases et kinases chez les mammifères (Smoly et al., 2017), la O-GlcNAcylation est contrôlée par seulement deux enzymes, l'OGT et l'OGA.

En fait, il existe plusieurs façons dont la O-GlcNAcylation et la phosphorylation peuvent être liées : I) compétition pour le même résidu (Yin-Yang), II) compétition séquentielle avec la phosphorylation sur les résidus voisins, III) régulation de l'OGT par les kinases, IV) régulation des kinases par l'OGT.

Le facteur de transcription c-Myc a été la première démonstration de la compétition entre phosphorylation et O-GlcNAcylation : la phosphorylation de c-Myc sur Thr58 entraîne sa dégradation par le protéasome, tandis que la O-GlcNAcylation sur le même résidu augmente sa stabilité et son activité (Kamemura et al., 2002).

Un autre exemple de compétition entre phosphorylation et O-GlcNAcylation est CRTC2 (*CREB Regulated Transcription Coactivator 2*) ; CRTC2 est retenu dans le cytoplasme par la phosphorylation des résidus Ser70 et Ser171. La O-GlcNAcylation de CRTC2 sur ces mêmes résidus stimule la translocation nucléaire de CRTC2 où il induit la transcription de ses gènes cibles impliqués dans le contrôle de la gluconéogenèse (Dentin et al., 2012).

L'influence de la phosphorylation et de la O-GlcNAcylation sur les résidus voisins est illustrée par la protéine tumorale p53 pour laquelle la O-GlcNAcylation sur la Ser149 est associée à sa stabilité et corrélée à une diminution de la phosphorylation du résidu Thr155, médiée par la protéine de liaison JAK (Jab1) (Yang et al., 2006 ; Lee et al., 2017).

Un exemple d'O-GlcNAcylation en tant que régulateur de l'activité des phosphatases ou kinases est la condition d'hyperinsulinisme. Dans ces conditions, l'OGT est recruté à la membrane plasmique via son domaine PPO (Yang et al., 2008) où elle est activée par phosphorylation (Whelan, Lane et Hart, 2008). La O-GlcNAcylation des protéines clés de signalisation de l'insuline telles que AKT et IRS2 (*insulin receptor substrate 2*) (Yang et al., 2008) conduisant à l'inhibition du signal de l'insuline (Zhang, Yin et Yang, 2014). Ce mécanisme apparaît comme un moyen de contrôler négativement la signalisation de l'insuline.

2.4b) Interaction avec l'ubiquitination

L'ubiquitination est une modification post-traductionnelle se produisant sur les résidus lysine (Lys) ; elle cible les protéines pour la dégradation protéasomale. L'interaction entre la O-GlcNAcylation et l'ubiquitination a été étudiée au cours des dernières années (Ruan, Nie et Yang, 2013, Schmidt et al., 2014, Paredes et al., 2020).

Par exemple, l'expression de p53 est étroitement contrôlée par la dégradation protéasomale médiée par l'ubiquitination. Suite à des traitements par du Thiamet-G (inhibition de l'activité de l'OGA) ou par la surexpression de l'OGT, l'augmentation de la O-GlcNAcylation de p53 favorise sa stabilisation de par inhibition de son ubiquitination et de sa dégradation (De Queiroz et al., 2016).

Dans des exemples spécifiques, la O-GlcNAcylation des protéines est également associée au recrutement de déubiquitinases. C'est le cas du coactivateur de PGC-1 α (*Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 α*) dont la O-GlcNAcylation facilite le recrutement de BAP1 (*BRCA1 associated protein-1*) protégeant ainsi PGC-1 α de la dégradation (Ruan et al., 2012 ; Lane et al., 2019).

Chapitre 2 : les points importants

1. L'OGT est une glycosyl transférase qui modifie les résidus Serine et Thréonine des protéines cibles, localisées dans le cytoplasme, dans le noyau et dans les mitochondries.
2. L'OGA est l'enzyme qui hydrolyse l'O-GlcNAcylation des protéines cibles de l'OGT.
3. La balance OGT /OGA doit être maintenue à l'équilibre, la perturbation de cet équilibre conduisant à des situations pathologiques.
4. La O-GlcNAcylation établit un dialogue permanent avec d'autres modifications post-traductionnelles, tels que la phosphorylation et l'ubiquitination.

Chapitre 3 : O-GlcNAcylation et physiopathologie hépatique

3.1) O-GlcNAcylation dans l'hépatopathie stéatosique métabolique

L'hépatopathie stéatosique métabolique (MASLD, pour *metabolic-dysfunction associated steatotic liver disease*) est une cause croissante de maladie hépatique chronique dans le monde entier et se caractérise par une stéatose, une inflammation du foie et une fibrose progressive. Plusieurs modèles animaux de MASLD, obtenus par des régimes alimentaires spécifiques ou des manipulations génétiques, ont permis d'approfondir nos connaissances sur son étiologie et sa physiopathologie (Parlati et al., 2019).

L'étiopathogénie de la MASLD est basée sur une interaction complexe entre le métabolisme du glucose et des lipides dans le foie, les facteurs génétiques et environnementaux (**Figures 17 et 18**).

La résistance hépatique à l'insuline est fortement associée au développement de la MASLD impactant le métabolisme énergétique du corps entier.

La MASLD consiste en une maladie hétérogène qui, histologiquement, peut être divisée en stéatose simple et MASH (*metabolic-dysfunction associated steatohepatitis*) (**Figure 17**). La stéatose simple est caractérisée par la présence d'au moins 5% de stéatose hépatique sans la présence d'atteinte hépatique sous forme de ballonnisation (hépatocytes augmentés de taille, à cytoplasme claire) et inflammation hépatique. Cependant, la MASH correspond à la présence d'au moins 5% de stéatose hépatique accompagnée d'inflammation et d'atteinte hépatique avec ou sans fibrose (Stefan, Haring et Cusi, 2019).

La MASLD a été reconnue comme un risque indépendant de carcinome hépatocellulaire (CHC).

Dans les chapitres suivants, je fournirai une mise à jour des voies moléculaires impliquées dans la physiopathologie de la MASLD et régulées par l'OGT.

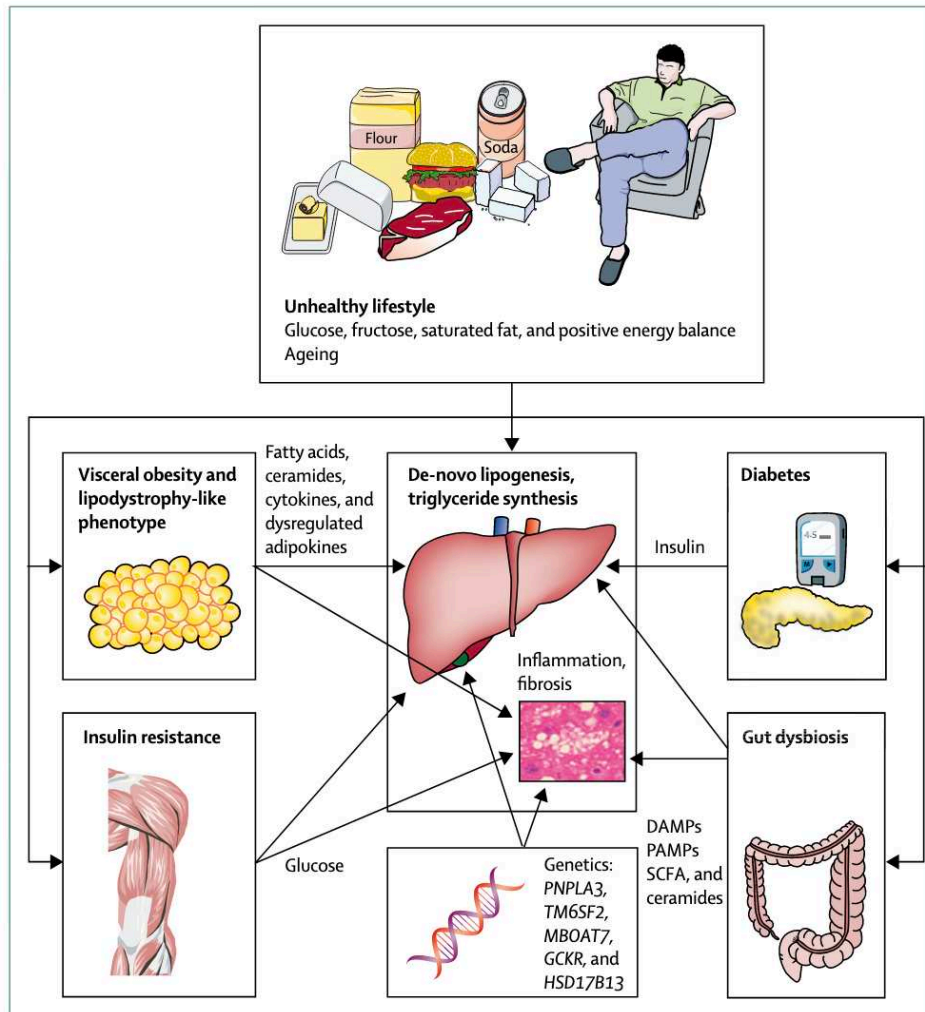


Figure 17 : Causes de la MASLD

Un mode de vie impliquant un bilan énergétique positif avec une augmentation des apports caloriques, notamment de glucose, de fructose et des graisses saturées et la sédentarité entraîne une augmentation de la masse grasse totale et viscérale, un diabète de type 2, une dysbiose intestinale, une résistance à l'insuline et augmentation de la lipogenèse hépatique de novo. Dans ces conditions, l'hyperinsulinémie et l'hyperglycémie associées au diabète exacerbent la lipogenèse hépatique de novo. La dysbiose intestinale via la libération accrue de DAMPs (damage-associated molecular patterns) et de PAMPs (pathogen-associated molecular patterns), tels que les lipopolysaccharides, et la libération dérégulée de SCFA (short-chain fatty acids) et de céramides, peuvent provoquer une inflammation et une fibrose hépatiques. Ce processus est amplifié par un phénotype de type lipodystrophie avec l'expansion du tissu adipeux viscéral, entraînant une libération accrue d'acides gras et de céramides et une dérégulation des cytokines et adipokines. Une prédisposition génétique à l'accumulation de lipides hépatiques, à l'inflammation et à la fibrose contribue également à la pathogenèse de la MASLD (D'après Stefan, Haring et Cusi, 2019).

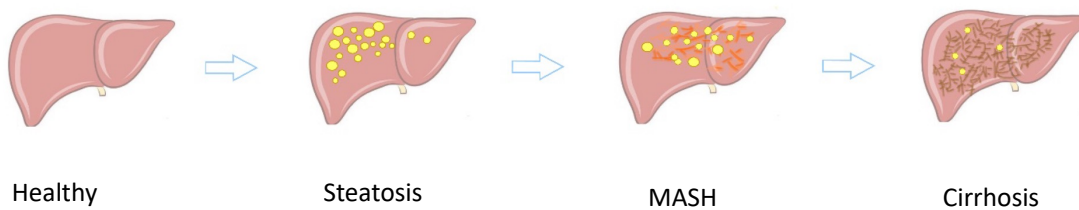


Figure 18 : Représentation de l'évolution de MASLD

La stéatose simple est caractérisée par la présence d'au moins 5% de stéatose hépatique sans la présence d'atteinte hépatique sous forme de ballonnisation et inflammation hépatique. Cependant, la MASH correspond à la présence d'au moins 5% de stéatose hépatique accompagnée d'inflammation et d'atteinte hépatique avec ou sans fibrose.

3.1a) O-GlcNAcylation et résistance à l'insuline

L'insuline est une hormone peptidique aux propriétés anabolisantes produite par les cellules β -pancréatiques. La liaison de l'insuline à son récepteur provoque une auto-phosphorylation du récepteur puis une phosphorylation de ses substrats clés, en particulier les substrats 1 et 2 du récepteur de l'insuline (IRS-1 et IRS-2) (Khan et al., 2019). En conditions physiologiques, l'insuline stimule le transport de glucose dans le tissu adipeux et dans le muscle. Dans le foie, l'insuline agit à plusieurs niveaux en favorisant le métabolisme des glucides *via* la glycogénèse, permettant ainsi la mise en réserve de glucose sous forme de glycogène et en inhibant la néoglucogénèse (synthèse *de novo* du glucose). L'insuline stimule également la synthèse d'acides gras *de novo* à partir du glucose (lipogénèse *de novo*) ainsi que la sécrétion hépatique de lipoprotéines riches en triglycérides (TG) ou lipoprotéines de très faible densité (VLDL, pour *very low density lipoproteins*), qui seront stockées dans le tissu adipeux.

En outre l'insuline stimule le métabolisme des protéines, via la voie mTOR, en favorisant l'entrée de certains acides aminés dans la cellule, en même temps que l'entrée du glucose dans les tissus périphériques.

La résistance à l'insuline est une caractéristique de la MASLD et contribue à sa pathogénèse (Loomba et al., 2012, Xie et al., 2023) (**Figure 19**). L'absence de freinage de la production hépatique de glucose est une des caractéristiques métaboliques du diabète de type 2 et elle est en partie secondaire à une insulino-résistance hépatique. La résistance à l'insuline, pourtant caractérisée par une réduction des effets

hypoglycémiant de l'insuline, permet cependant le maintien d'une lipogénèse active, via l'activation du facteur de transcription SREBP-1c (*sterol regulatory element binding protein 1c*) (Loomba et al., 2012). C'est la notion de « sélectivité » de la résistance à l'insuline.

Ainsi, chez les patients ayant un syndrome métabolique ou un diabète de type 2, l'insulino-résistance entraîne une augmentation de la production hépatique de glucose et l'apparition du diabète. Dans le même temps, la voie lipogénique impliquant notamment SREBP-1c reste fonctionnelle et sa stimulation constante en situation d'hyperinsulinémie favorise la stéatose hépatique et la dyslipidémie combinée (Brown et Goldstein, 2008).

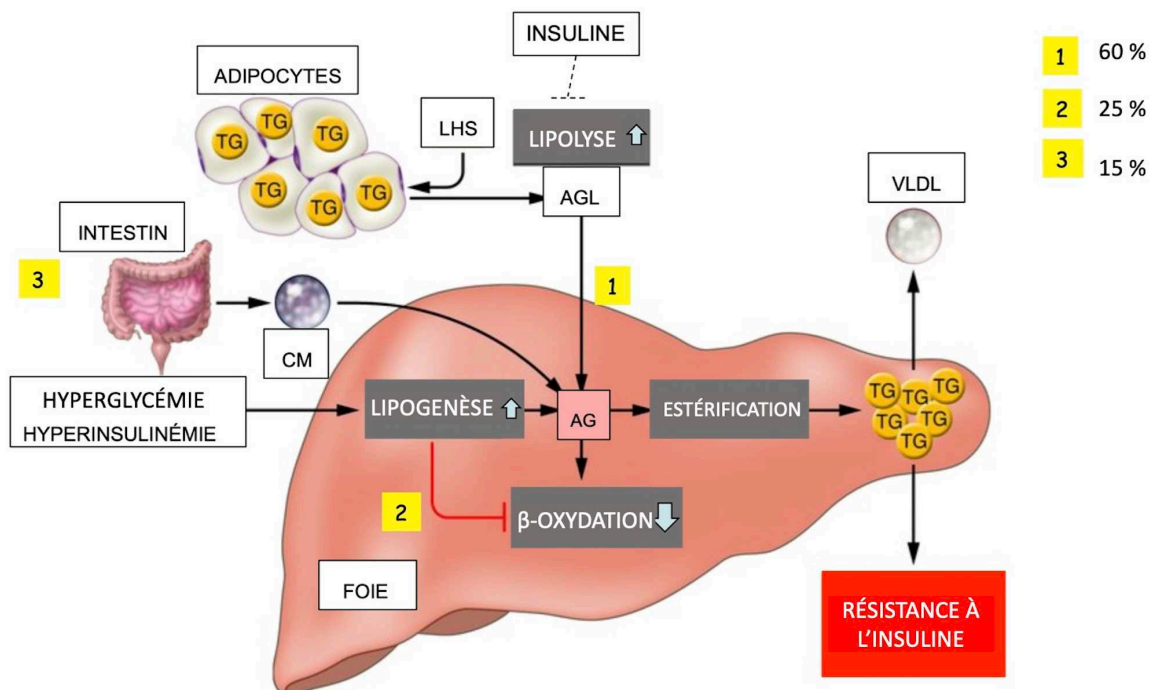


Figure 19 : Les voies métaboliques affectées chez les patients résistants à l'insuline

Les acides gras utilisés pour la synthèse des triglycérides proviennent non seulement du pool plasmatique d'acides gras non estérifiés (issus de la lipolyse du tissu adipeux non inhibée par l'insuline), mais également des acides gras néo-synthétisés à partir du glucose par la voie de la lipogénèse hépatique, qui, malgré l'état de résistance reste active selon le concept de « sélectivité de résistance à l'insuline ». (LHS : Lipase hormono-sensibles ; VLDL : very low density lipoproteins ; CM : chylomicrons ; AGL : acides gras libres ; TG : triglycérides).

Dans la MASLD, il existe un état inflammatoire sous-jacent (avec une augmentation des cytokines circulantes telles que l'interleukine IL-6 et le $TNF\alpha$ qui peut lui-même contribuer à la résistance à l'insuline. En effet, $TNF\alpha$ favorise la lipolyse des adipocytes ainsi que l'activation des protéines kinases liées au stress, y compris la JNK ((*c-Jun N-terminal kinase*) et l'IKK- β (*inhibiteur de kappa-B kinase β*). Ceux-ci induisent la phosphorylation de l'IRS-1 sur des résidus sérines, ce qui atténue les effets médiés par l'insuline. Chez la souris, l'inhibition de $TNF\alpha$ ou de son récepteur est associée à une meilleure sensibilité à l'insuline (Hotamisligil, Shargill and Spiegelman, 1993).

La résistance à l'insuline hépatique provoque une dérégulation des voies métaboliques clés, notamment la néoglucogenèse et la synthèse du glycogène. L'OGT régule plusieurs enzymes et régulateurs transcriptionnels de ces voies. De plus, la surexpression hépatique *in vivo* de l'OGT altère la signalisation de l'insuline, provoquant une résistance à l'insuline et une dyslipidémie chez la souris (Yang et al., 2008). Dans des conditions de diabète de type 2, la dérégulation de la gluconéogenèse est l'une des principales caractéristiques hépatiques contribuant à l'hyperglycémie. Il a été récemment démontré que la O-GlcNAcylation de p53 stabilise la protéine qui se lie au promoteur de PCK1 (*phosphoenolpyruvate carboxykinase 1*) et régule son activation transcriptionnelle, contrôlant ainsi la production hépatique de glucose (Gonzalez-Rellan et al., 2021). En outre, la O-GlcNAcylation de FoxO1 (*Forkhead box O1*) hépatique est augmentée dans le diabète. La O-GlcNAcylation régule l'activation de FoxO1 en réponse au glucose (Kuo et al. 2008, Housley et al., 2008), ce qui entraîne paradoxalement une expression accrue de gènes gluconéogéniques tout en induisant simultanément l'expression de gènes codant pour des enzymes qui détoxifient les ROS (espèces réactives de l'oxygène). La GlcNAcylation de FoxO est un mécanisme de contrôle direct de la transcription par les nutriments afin de réguler le métabolisme et la réponse au stress par le contrôle de l'activité de FoxO1 (Housley et al., 2008).

Les souris nourries avec un régime riche en graisses et les souris *db/db* présentent des niveaux élevés de O-GlcNAcylation dans le foie (Dentin et al. 2008). La diminution de la O-GlcNAcylation hépatique *via* la surexpression de l'OGA entraîne une diminution de la gluconéogenèse et de l'hyperglycémie (Dentin et al., 2008). Les souris

nourries avec un régime riche en graisses et les souris *db/db* présentent également des niveaux élevés de HCF-1 (*host cell factor 1*, cf chapitre 2) corrélés à une augmentation de la gluconéogenèse et de l'hyperglycémie. Les souris invalidées pour le HCF-1 et pour l'OGT hépatiques ont une restauration de l'homéostasie du glucose (Ruan et al., 2012).

3.1b) O-GlcNAcylation et régulation de la lipogenèse

Dans la physiopathologie de la MASLD, différentes sources d'acides gras contribuent au développement de la stéatose hépatique. Dans des conditions de résistance à l'insuline, il y a une libération dérégulée des acides gras libres (AGL) par le tissu adipeux blanc, en raison de la diminution de l'action anti-lipolytique de l'insuline (Kraegen et al., 2001). En conséquence, les lipides périphériques stockés dans le tissu adipeux s'écoulent vers le foie sous forme d'AGL. Les acides gras alimentaires sont également captés par le foie par l'absorption de chylomicrons d'origine intestinale. De plus, la combinaison de concentrations élevées de glucose plasmatique (hyperglycémie) et d'insuline (hyperinsulinémie) favorise la synthèse *de novo* des acides gras (lipogenèse) et altère la β -oxydation, contribuant ainsi au développement de la stéatose hépatique (**Figure 20**). Après l'étape d'estérification (conversion des AGL en triglycérides), ceux-ci sont stockés sous forme de gouttelettes lipidiques dans les hépatocytes ou sécrétés dans le sang sous forme de lipoprotéines de très faible densité (VLDL).

Dans le contexte de la MASLD, une augmentation de la β -oxydation mitochondriale en réponse à l'augmentation de la lipogenèse a été rapportée. Un dysfonctionnement mitochondrial concomitant, entraînant un stress oxydant, peut inhiber la signalisation de l'insuline. Koliaki *et al.* ont démontré que les patients avec une MASLD ont une augmentation des taux de consommation d'oxygène dans les tissus hépatiques et les mitochondries hépatiques isolées, mais ceux-ci sont diminués lorsque la MASH se développe (Koliaki et al. 2015). Une explication possible serait que les mitochondries hépatiques puissent compenser une surcharge nutritionnelle chronique avec une activité accrue aux premiers stades de la MASLD (concept de « flexibilité » mitochondriale), alors qu'à des stades ultérieurs, les mitochondries seraient dans

l'incapacité de compenser (« inflexibilité » mitochondriale). L'insuffisance mitochondriale énergétique peut entraîner : 1) une oxydation incomplète des lipides et de la synthèse d'intermédiaires lipidiques toxiques, qui altèrent la signalisation de l'insuline, 2) la production des ROS et 3) une inflammation et des lésions hépatocytaires (Koliaki et al. 2015).

Plusieurs classes d'acides gras sont associées à la lipotoxicité hépatique. L'accumulation des AGL dans les hépatocytes entraîne des lésions hépatiques par différents processus de lipotoxicité : I) l'activation des récepteurs Toll-like 4 (TLR4), qui déclenche l'activité de NF- κ B (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) avec la production de cytokines inflammatoires ; II) le récepteur 2 du ligand inducteur d'apoptose liée au TNF (TRAIL-R2) qui déclenche les caspases 3, 6 et 7 avec une induction de l'apoptose. Les AGL intra-hépatiques peuvent également activer directement le stress du réticulum endoplasmique et JNK. JNK semble être le médiateur principal de la lipotoxicité des AGL car il inactive IRS-1, altère la respiration mitochondriale et augmente la production de ROS. De plus, JNK inhibe l'expression de FGF21 (*fibroblast growth factor-21*), une hépatokine clé aux propriétés bénéfiques sur l'homéostasie énergétique. Les effets lipotoxiques des AGL ne sont pas limités aux cellules hépatiques et affectent aussi les cellules étoilées hépatiques. Dans les cellules étoilées hépatiques, l'activation du TLR4 par les AGL conduit à la production des cytokines pro-inflammatoires (qui activent JNK dans les cellules de Kupffer, les macrophages résidents) et à la sécrétion du TGF β .

La O-GlcNAcylation pourrait être un mécanisme contrôlant le maintien paradoxal de la lipogénèse dans des conditions de résistance à l'insuline. L'OGT supprime la signalisation de l'insuline en même temps qu'il potentialise la lipogénèse *via* la O-GlcNAcylation de ChREBP. En effet, la protéine ChREBP est hyper-O-GlcNAcylée dans le foie des souris diabétiques et la diminution de la O-GlcNAcylation *via* la surexpression de l'OGA réduit l'activité de ChREBP et la stéatose hépatique (Guinez et al., 2011). LXR (*liver X receptor*), un autre facteur de transcription impliqué dans la lipogénèse, est O-GlcNAcylé et ceci est corrélé positivement avec les lipides intrahépatiques, l'inflammation et la fibrose chez les patients ayant une MASLD (Ahn et al., 2014). L'activation de LXR a le potentiel de moduler l'homéostasie du cholestérol, d'améliorer la sensibilité à l'insuline et d'induire des réponses anti-

inflammatoires. Cependant, l'activation de LXR stimule également la lipogenèse et l'hypertriglycéridémie, ce qui est considéré comme un effet secondaire du traitement de la stéatose avec des agonistes de LXR (Nie et Yi, 2019).

Cependant, l'OGT, qui est associée au développement de maladies métaboliques telles que la MASLD, active également deux facteurs de transcription qui régulent négativement la lipogenèse hépatique, FXR (Berrabah et al., 2014) et FoxO1 (Kuo et al., 2008, Housley et al., 2008) (**Figure 20**).

Comme mentionné au chapitre 1, FXR est un récepteur nucléaire hépatique dont l'activation provoque des effets bénéfiques tels qu'une amélioration du métabolisme du glucose, une augmentation de la sensibilité à l'insuline et une diminution de la lipogenèse hépatique. Cependant, la génération de souris invalidées pour le FXR ou/et pour sa cible SHP a démontré que la réduction de la stéatose hépatique est, au moins en partie, médiée par le SHP (Akinrotimi et al., 2017). Chez les patients MASH, le déficit en FXR provoque la progression et le développement exacerbé de la MASH. En revanche, l'activation de FXR est associée à une protection contre l'inflammation et la fibrose du foie (Armstrong et Guo, 2017).

FoxO1 supprime l'expression de SREBP1, entraînant une diminution de l'accumulation des TG, régule positivement l'oxydation des acides gras (*FAO : fatty acid oxidation*) et favorise l'expression d'enzymes contrôlant le métabolisme et le transport des acides biliaires. FoxO1 pourrait potentiellement contribuer à la protection contre la MASLD (Dong, 2017).

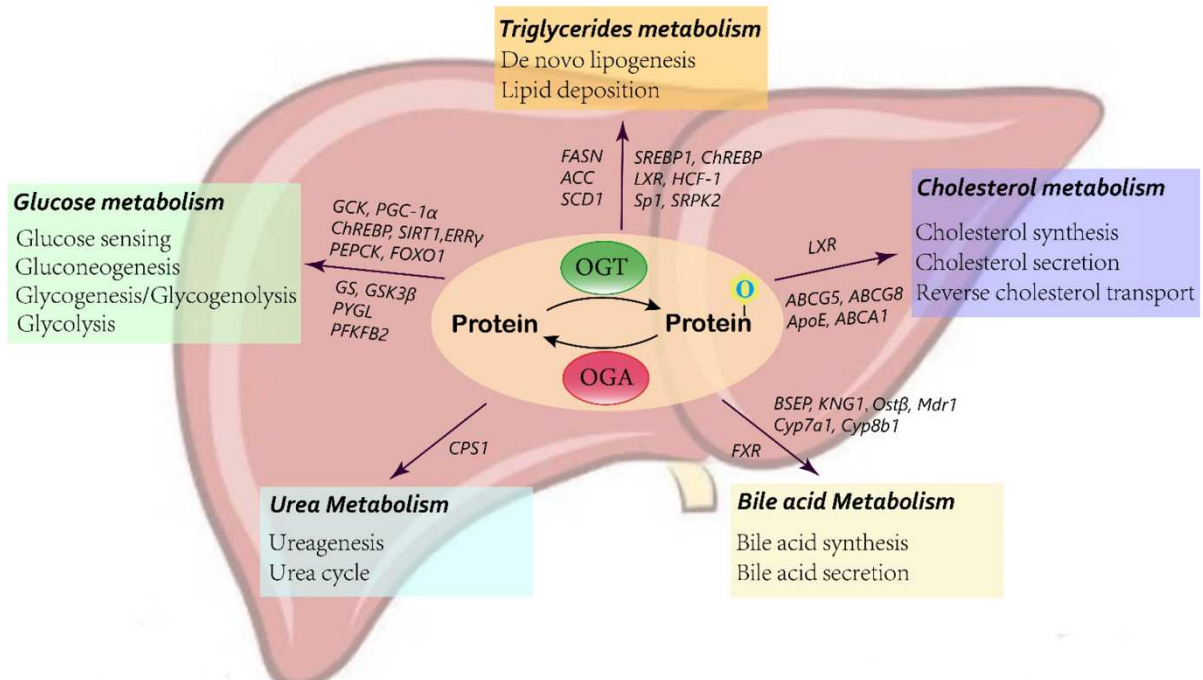


Figure 20 : Rôle de la O-GlcNAcylation dans le contrôle du métabolisme hépatique (D'après Ziyan et al., 2023).

3.1c) Signalisation des acides biliaires et de FXR dans la MASLD et la MASH

En tant que récepteur intracellulaire majeur et régulateur clé de l'homéostasie des acides biliaires, ainsi que du métabolisme des lipides et du glucose (**Figure 21**), FXR est devenu une cible thérapeutique centrale pour les maladies hépatiques cholestatiques et la MASH. Les souris invalidées pour FXR présentent une homéostasie des acides biliaires sévèrement perturbée (Sinal et al., 2000) et les variantes génétiques de FXR chez l'homme provoquent un sous-type de cholestase intrahépatique familiale progressive (Gomez-Ospina et al., 2016) soulignant le rôle clé de FXR dans l'homéostasie des acides biliaires et la pathogenèse de la cholestase.

Dans la MASLD, l'activation de FXR par les acides biliaires est impliquée dans la régulation de la lipogenèse hépatique et du métabolisme des lipoprotéines, de la gluconéogenèse, et de la synthèse du glycogène et la sensibilité à l'insuline (Chávez-

Talavera et al., 2017, Henry et al., 2023). En plus de la fonction hormonale physiologique des acides biliaires dans la régulation du métabolisme des lipides et du glucose, il y a aussi des preuves que l'homéostasie des acides biliaires est perturbée dans la MASH (Chávez-Talavera et al., 2017).

Avec l'augmentation de la sévérité de la MASH et de la fibrose hépatique, les niveaux des acides biliaires ont tendance à augmenter et leur composition change, ce qui peut en partie aggraver la résistance à l'insuline (Legry et al., 2017). Malgré l'augmentation des niveaux des acides biliaires dans la MASH, la signalisation FXR et FGF19 est altérée, ce qui entraîne une augmentation ultérieure de la synthèse des acides biliaires (Nobili et al., 2018, Jiao et al., 2018). Cette augmentation des acides biliaires intra-hépatique pourraient contribuer aux lésions hépatocellulaires et même la carcinogenèse dans la MASH (Yoshimoto et al., 2013).

Ainsi, la restauration de la signalisation FXR et des acides biliaires et l'homéostasie lipidique peuvent expliquer au moins une partie des effets thérapeutiques des agonistes de FXR dans la MASLD (Younossi et al., 2019). De plus, des anti-inflammatoires et effets anti-fibrotiques ainsi qu'une fonction endothéliale améliorée médiée par FXR peut également y contribuer (Li et al., 2008).

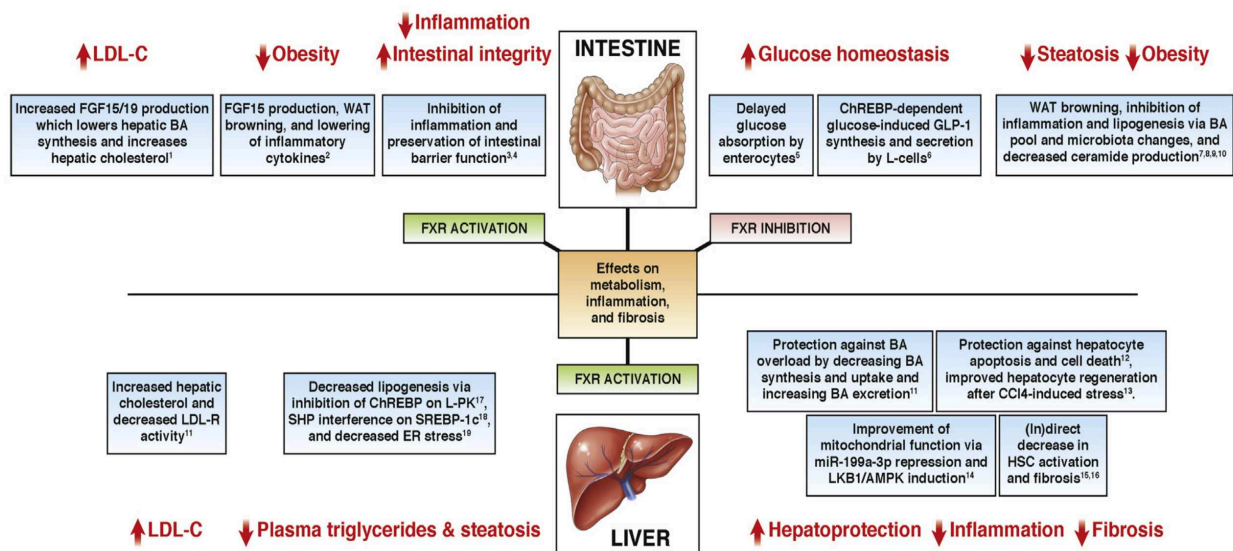


Figure 21 : Effets de la signalisation de FXR dans le foie et dans l'intestin

L'inactivation spécifique de FXR au niveau intestinal prévient l'obésité, le DT2 et la MASLD chez les rongeurs. De manière contradictoire, la fexaramine, activateur du FXR intestinal, confère des effets bénéfiques similaires. Au niveau hépatique, FXR exerce des activités

hépatoprotectrices, en améliorant la stéatose, l'inflammation et la fibrose. (D'après Chávez-Talavera et al., 2017).

3.1d) OGT et stress du réticulum endoplasmique (RE)

Les lésions hépatocellulaires dans la MASH sont causées par un stress du RE (Han et al., 2016, Lebeau-pin et al., 2018), une dysfonction de l'UPR (*unfolded protein response*) (Puri et al., 2008), une activation de l'inflammasome (Szabo G et Petrasek J, 2015), une activation des voies apoptotiques et une inflammation incontrôlée. Les lipides toxiques comme les AGL, le diacylglycérol (DAG), les phospholipides et le cholestérol libre activent différentes voies de stress cellulaire. L'épicentre de ces réponses est le RE, un réseau qui participe à la synthèse et l'assemblage de protéines sécrétoires et membranaires pour atteindre leur conformation appropriée. Le maintien de la fonction du RE nécessite des concentrations élevées de Ca^{2+} intra-RE, contrôlées par la SERCA (*sarco-endoplasmic reticulum calcium ATPase*). L'accumulation du cholestérol libre au niveau du RE altère le rapport critique cholestérol-phospholipides libres de la membrane du RE, qui est crucial pour le maintien de sa fluidité. La SERCA est très sensible aux changements de la fluidité de la membrane. De tels changements induisent une diminution des concentrations de Ca^{2+} intra-RE, ce qui se traduit par une altération de la fonction du RE connue sous le nom de stress du RE. Ce dernier est l'un des facteurs importants de la progression de la MASH avec l'induction de l'apoptose hépatocytaire et l'activation des cellules étoilées hépatiques et des cellules de Kupffer. La réponse des protéines chaperonnes est diminuée dans le foie de souris obèses en raison d'un dysfonctionnement de XBP1 (*X-box binding protein 1*), un régulateur majeur de la capacité de repliement du RE et des gènes clés de la lipogenèse hépatique (Park et al., 2010A). Les souris invalidées pour la XBP1 dans le foie ont une lipogenèse hépatique *de novo* diminuée et une stéatose réduite en réponse à un régime riche en lipides (So et al., 2012). Alors que l'expression membranaire de SERCA dans le RE est diminuée dans le foie des souris obèses, son augmentation permet d'améliorer le stress du RE (Park et al., 2010B). Chez l'homme, l'expression de XBP1 est élevée dans la MASH mais pas dans le contexte de la stéatose simple (Lake et al., 2014).

L'OGT est impliquée dans les voies de signalisation activées lors des conditions de stress du RE (**Figure 22**). Le eIF2 α (*eukaryotic initiation factor 2*) est O-GlcNAcylé sur

les résidus Ser219, Thr239 et Thr241 dans les cellules HepG2. La mutation ponctuelle sur ces résidus pour empêcher la O-GlcNAcylation augmente la phosphorylation de eIF2 α sur la Ser51 et la traduction consécutive de CHOP (*C/EBP homologous protein*), un facteur de transcription impliqué dans la régulation de l'apoptose (Jang et al., 2015). De plus, dans les cardiomyocytes traités avec des inducteurs du stress du RE, la surexpression par adénovirus de l'OGT ou l'inhibition pharmacologique de l'OGA atténue l'activation de CHOP induite par le stress et la mort cellulaire, ce qui suggère qu'une augmentation de la O-GlcNAcylation pourrait représenter une réponse partiellement adaptative pour réduire la mort cellulaire induite par le stress du RE (Ngoh et al., 2009). Des résultats similaires ont été montrés dans un modèle de lapin avec des lésions d'ischémie/reperfusion rénales, dans lequel l'administration de glucose a réduit l'expression de CHOP (Suh et al., 2014).

Dans les cardiomyocytes, il a été décrit que XBP1 stimule la voie des hexosamines entraînant ainsi une augmentation de la O-GlcNAcylation (Wang et al., 2014). Puisqu'il a été rapporté que la O-GlcNAcylation réduit l'apoptose induite par le stress du RE (Ngoh et al., 2009), XBP-1 pourrait faire partie d'une boucle de rétro-régulation positive de la O-GlcNAcylation pour améliorer le stress du RE. Dans l'ensemble, ces données suggèrent un rôle essentiel de l'OGT et de l'O-GlcNAcylation dans la limitation du stress du RE et la prévention de l'apoptose cellulaire.

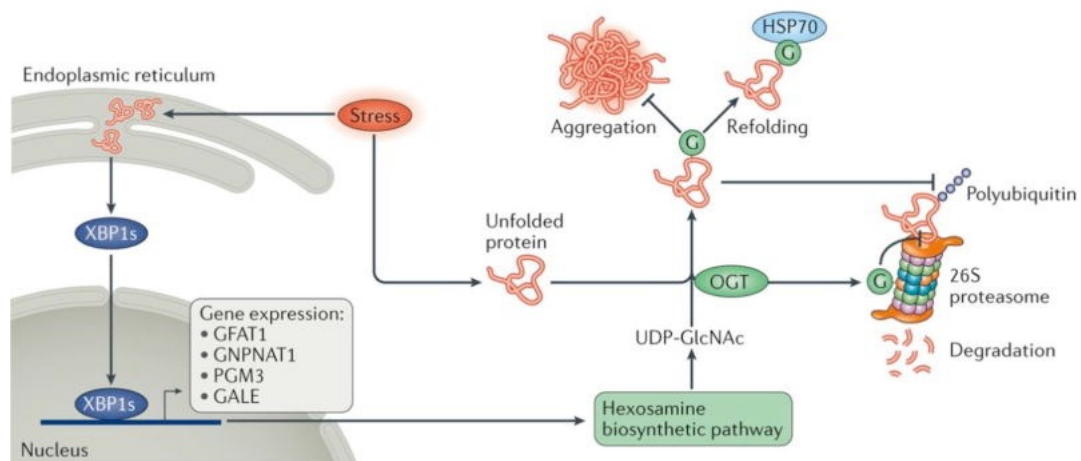


Figure 22 : O-GlcNAcylation et réponse au stress du réticulum endoplasmique

L'accumulation de protéines mal repliées dans le réticulum endoplasmique active la voie de biosynthèse de l'hexosamine (HBP) via le facteur de transcription XBP1). Une production accrue d'UDP-GlcNAc par le HBP peut conduire à une O-GlcNAcylation non spécifique des protéines mal repliées dans le cytoplasme. La O-GlcNAcylation de ces protéines peut

bloquer leur agrégation et leur dégradation protéasomale ainsi que faciliter leur repliement par des chaperons (D'après Yang et Qian, 2017).

3.1e) OGT et stress oxydant

Dans la MASH, le stress oxydant est induit par les ROS produites par les mitochondries, les peroxysomes et les microsomes entraînant une apoptose ainsi que des dommages de l'ADN mitochondrial. Les défenses antioxydantes limitées contribuent aux processus de la MASH et de l'hépatocarcinogénèse (Kawai et al., 2012). Cependant, des niveaux physiologiquement faibles de ROS sont impliqués dans les processus cellulaires, indiquant que le maintien d'un équilibre entre production des ROS et réponse antioxydante est important.

Dans des conditions physiologiques, la majorité des ROS toxiques, telle que le superoxyde, sont détoxifiées par une variété de défenses antioxydantes et les concentrations de ROS à l'état d'équilibre sont maintenues à des niveaux relativement bas (moins de 1 % de l'oxygène total consommé par les mitochondries) (Brand, 2010). Le dysfonctionnement mitochondrial altère, non seulement, l'homéostasie des lipides dans le foie, mais entraîne également un excès de stress oxydant, induisant la génération de ROS. Ces derniers déclenchent la peroxydation lipidique, l'augmentation de la production de cytokines pro-inflammatoires et la mort cellulaire. En effet, des altérations ultra-structurales, une altération de la synthèse de l'ATP et une augmentation de la production de ROS ont été rapportées dans les mitochondries hépatiques de patients ayant une MASH ainsi que dans un modèle de MASH de rongeur (Serviddio et al., 2008).

Le programme de prolifération et de différenciation mitochondriales peut être altéré dans la MASH. Un des régulateurs les plus importants de la biogenèse mitochondriale est PGC-1 α (*peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator*) (Scarpulla, 2011), qui coordonne un grand nombre de gènes requis pour ce processus. L'activité de PGC-1 α est altérée dans la stéatose hépatique, entraînant une diminution de la biogenèse mitochondriale (Aharoni-Simon et al. 2011). Dans les modèles de carcinome hépatocellulaire (CHC) liés à la MASH, l'expression de PGC-1 α est diminuée dans le CHC par rapport aux tissus non tumoraux, soulignant son importance dans le phénotype hépatocytaire (Wang, 2012).

Les cellules non parenchymateuses du foie, telles que les cellules de Kupffer et les cellules étoilées hépatiques, jouent un rôle important dans la progression de l'inflammation chronique et de la fibrose hépatique dans la MASH. Dans cette pathologie, l'accumulation des acides gras en excès dans les hépatocytes induit un stress oxydant non seulement des mitochondries, mais aussi des peroxysomes ou microsomes. Les ROS cytotoxiques et produits de la peroxydation lipidique sont capables de diffuser dans l'espace extracellulaire affectant les cellules de Kupffer et les cellules étoilées hépatiques par la synthèse de $TNF\alpha$ et de plusieurs cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-6 ou l'IL-8 (Hui et al., 2004). Les cellules de Kupffer chez les patients atteints de MASH produisent du $TGF\beta$ (Bataller et Brenner, 2005), ce qui permet aux cellules étoilées hépatiques d'acquérir un phénotype de type myofibroblaste fibrogène.

Étant donné que la O-GlcNAcylation est une modification sensible aux nutriments, il n'est pas surprenant que la O-GlcNAcylation et la signalisation redox soient intimement liées par le métabolisme cellulaire, une source majeure de ROS endogènes. Le facteur de transcription Nrf2 (*Nuclear factor erythroid 2-related factor 2*) est un régulateur majeur de la réponse cellulaire au stress oxydant et aux xénobiotiques (Jaramillo et Zhang 2013 ; Menegon et al. 2016). Dans les cellules en conditions physiologiques, Nrf2 s'associe à un complexe comprenant la protéine adaptatrice cytoplasmique KEAP1 (*Kelch-like ECH-associated protein 1*) et l'ubiquitine ligase CUL3 (Culline 3), qui ubiquitine Nrf2, le ciblant pour la destruction médiée par le protéasome (Jaramillo et Zhang 2013). En condition de stress cellulaire, divers toxiques (par exemple, des électrophiles ou des agents oxydants) modifient de manière covalente les cystéines redox-actives dans KEAP1, altérant la capacité de KEAP1/CUL3 à ubiquitiner Nrf2 (Jaramillo et Zhang 2013 ; Menegon et al. 2016) (**Figure 23**). Le Nrf2 libre migre ensuite vers le noyau, où il se lie aux promoteurs contenant des éléments de réponse antioxydante (ARE) et induit l'expression des gènes impliqués dans la défense antioxydante cellulaire, tels que la voie de biosynthèse du glutathion, les pompes à efflux des xénobiotiques et les enzymes métabolisant les médicaments (Hayes et al. 2010 ; Jaramillo et Zhang 2013 ; Menegon et al. 2016).

Il a été aussi rapporté que l'inhibition pharmacologique ou l'inactivation génétique de l'OGT dans de nombreux types de cellules humaines provoque une réponse antioxydante en activant la voie Nrf2 (Chen, Chi et al. 2017 ; Chen, Smith et al. 2017).

Fait intéressant, il n'a pas été observé d'augmentation de la production de ROS ou d'altération de l'équilibre du glutathion lors de l'inhibition de l'OGT, ce qui suggère que l'activation de Nrf2 est due à un signal spécifique médié par la O-GlcNAcylation, et non à un stress non spécifique.

En effet, il a été constaté que, dans des conditions physiologiques, KEAP1 est O-GlcNAcylé sur onze sites identifiés par spectrométrie de masse. Le site le plus important sur le plan fonctionnel est la Ser104. L'inhibition de la O-GlcNAcylation de KEAP1, en inhibant l'OGT ou en mutant KEAP1 en Ser104, réduit l'interaction de KEAP1 avec CUL3, entraînant une perte d'ubiquitination de Nrf2 (Chen, Chi et al. 2017).

Ainsi, dans des conditions physiologiques, la O-GlcNAcylation spécifique sur la Ser104 de KEAP1 est nécessaire pour son activité optimale, induisant l'ubiquitination de Nrf2 et inhibant ainsi la voie Nrf2. Conformément à cette idée, la O-GlcNAcylation de KEAP1 était corrélée à la disponibilité en glucose, car les conditions hypoglycémiques déclenchent la déglycosylation de KEAP1 et la signalisation médiée par Nrf2. L'inhibition de l'OGA bloque la déglycosylation de KEAP1 induite par l'hypoglycémie et prévient l'induction de Nrf2, suggérant que la disponibilité en glucose est détectée en partie par la O-GlcNAcylation de KEAP1 (Chen, Chi et al. 2017).

Dans l'ensemble, ces résultats ont révélé un nouveau lien entre la détection des nutriments et le métabolisme redox *via* la O-GlcNAcylation de KEAP1.

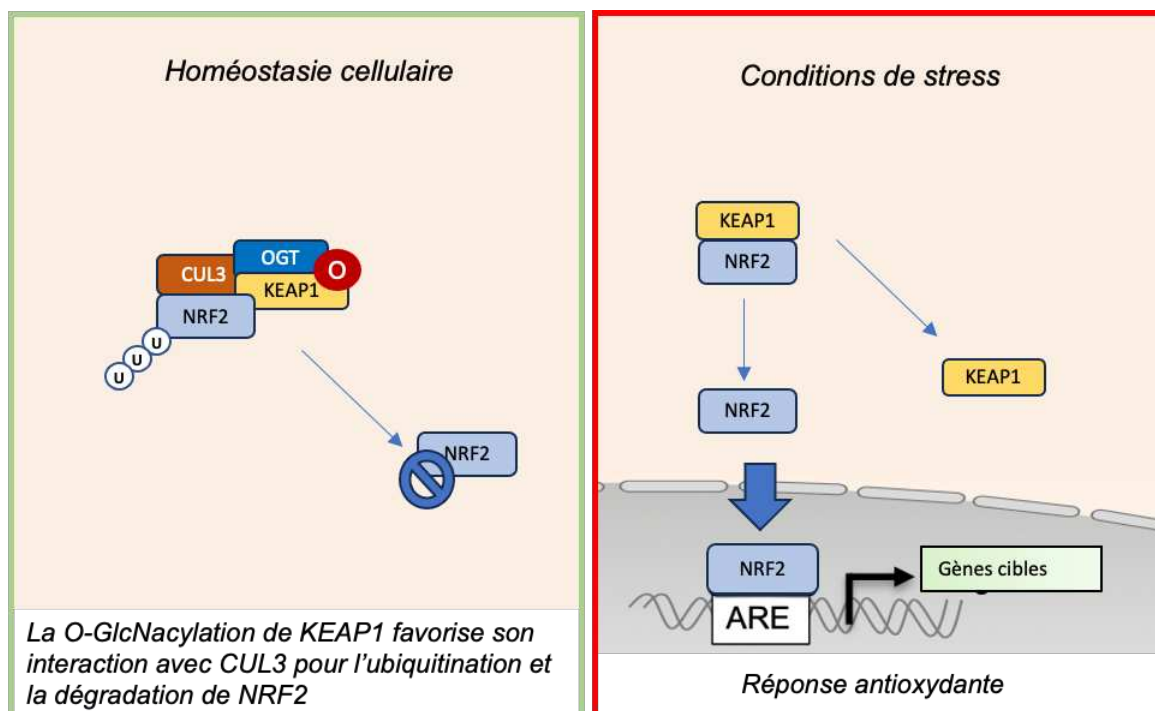


Figure 23 : Régulation de la voie de signalisation NRF2 par la O-GlcNAcylation

Dans des conditions physiologiques, KEAP1 est O-GlcNAcylé sur onze sites. Le site le plus important sur le plan fonctionnel est la Ser104. La O-GlcNAcylation de KEAP1 favorise son interaction avec CUL3 pour l'ubiquitination et la dégradation de NRF2. En condition de stress cellulaire, divers toxiques modifient de manière covalente les cystéines redox-actives dans KEAP1, altérant la capacité de KEAP1/CUL3 à ubiquitiner NRF2. Le NRF2 libre migre ensuite vers le noyau, où il se lie aux promoteurs contenant des éléments de réponse antioxydante (ARE) et induit l'expression des gènes impliqués dans la défense antioxydante cellulaire, telles que la voie de biosynthèse du glutathion, les pompes à efflux des xénobiotiques et les enzymes métabolisant les médicaments. (O : O-GlcNAcylation, U : ubiquitination).

3.2) O-GlcNAcylation et fibrose hépatique

La fibrose hépatique est un processus dynamique consistant en une accumulation de matrice extracellulaire (ECM) qui se produit à la suite d'une lésion hépatique chronique produite par une hépatite virale, par l'alcool ou d'autres effets toxiques, la MASLD, etc. Un événement critique de la fibrogenèse est l'activation des cellules étoilées quiescentes, principale source de l'ECM. Dans des conditions physiologiques, les cellules étoilées quiescentes contrôlent le renouvellement de l'ECM en sécrétant des quantités limitées de molécules de l'ECM, des métalloprotéinases avec leurs inhibiteurs. Cependant, une lésion hépatique active les cellules étoilées pour qu'elles se transforment en myofibroblastes fibrogéniques, qui produisent de l'actine musculaire lisse α (α -SMA), des composants de l'ECM et des enzymes de remodelage

de l'ECM. L'initiation de la fibrose est caractérisée par une induction rapide des récepteurs des facteurs de croissance, la signalisation et le développement d'un phénotype fibrogène et contractile. Bien que la fibrose puisse régresser après la fin de l'atteinte hépatique, une atteinte hépatique chronique peut causer une persistance de la fibrose conduisant à la cirrhose, qui consiste en une désorganisation de l'architecture hépatique associée à un flux sanguin anormal et éventuellement à une hypertension portale (Tsuchida et Friedman, 2017).

Une grande quantité de molécules et de voies impliquées dans l'activation des cellules étoilées sont contrôlées par l'OGT. Le facteur TGF β est considéré comme la cytokine fibrogène la plus puissante et il est libéré par plusieurs populations cellulaires sous forme inactive (Hellerbrand et al., 1999). Le TGF β se lie au récepteur TGF β de type I (TGF β R1), qui est phosphorylé activant la cascade des protéines SMAD (*mothers against decapentaplegic*), en particulier SMAD3, qui régule la transcription du collagène de type I et III (**Figure 24**). Le TGF β stimule également les voies non canoniques indépendantes du SMAD impliquant l'activation de la voie MAPK (*mitogen-activated protein kinase*), y compris l'ERK (*extracellular signal-regulated kinase*); p38 et JNK (Tsuchida et Friedman, 2017; Dewidar et al., 2019). Récemment, des niveaux élevés de la déméthylase TET3 (*ten-eleven-translocation 3*) ont été décrits dans le foie fibrotique murin et humain (Xu et al., 2020). TET 3 est une cible de l'OGT (Ito et al., 2014). Les auteurs ont démontré que dans les cellules étoilées humaines, TET3 favorise l'expression des gènes pro-fibrotiques clés de la voie TGF β , y compris TGF β 1. La même étude a démontré une amélioration de la fibrose hépatique chez les souris invalidées pour TET3 (Xu et al., 2020).

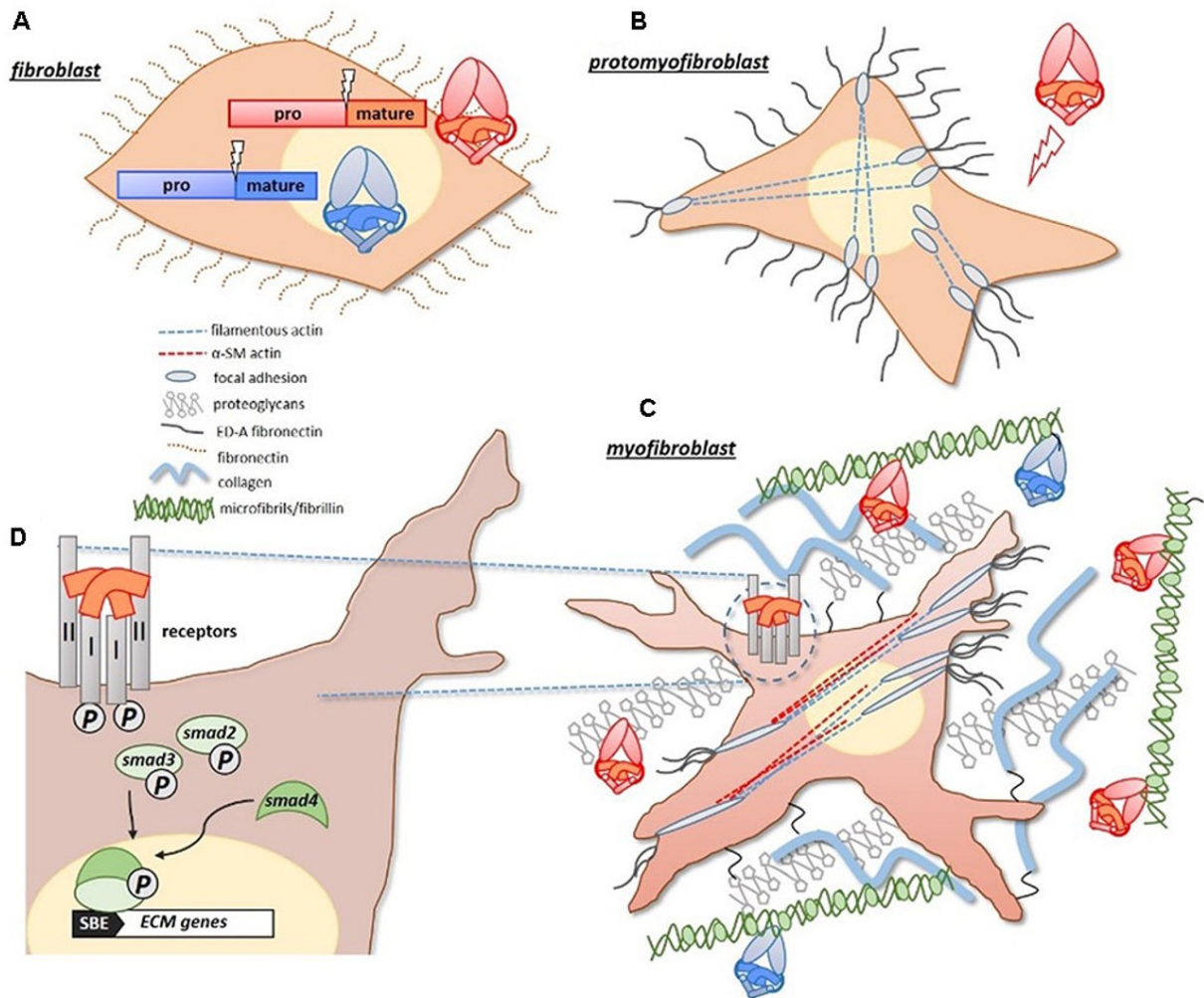


Figure 24 : La voie de signalisation canonique de TGFβ

A. Les ligands pro-fibrotiques du récepteur du TGFβ, y compris le TGFβ1 et les activines (rouge/orange), ainsi que les ligands anti-fibrotiques (bleu) sont synthétisés de manière similaire sous forme de protéines précurseurs avec des domaines pro-/mature.

B. En cas de lésion hépatique, les fibroblastes quiescents se différencient en proto-myofibroblastes qui expriment des filaments d'actine qui s'étendent à partir d'un complexe d'adhérence focale et expriment la fibronectine extracellulaire.

C. Avec une exposition accrue au TGFβ et à la fibronectine extracellulaire, les proto-myofibroblastes deviennent des myofibroblastes sécrétant une matrice entièrement différenciée. La présence identifiable de l'α-SMA confère aux myofibroblastes leur contractilité. Le TGFβ et les activines ont une affinité naturelle pour les protéines de la matrice, telles que la fibrilline (microfibrilles) et les protéoglycans, et se concentrent dans la matrice de la fibrose.

D. Les activités du TGFβ et des activines sont initiées à la surface cellulaire, où elles forment des complexes avec les récepteurs de type I/II. L'activation des récepteurs conduit à une cascade de phosphorylation intracellulaire impliquant les facteurs de transcription SMAD-2/3. Le SMAD-2/3 se complexe avec le SMAD-4 et se transloque vers le noyau où il contrôle l'expression des gènes cibles de la matrice. (D'après Gabbiani., 2003).

Le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF) est un mitogène hépatique important, contrôlant la prolifération et la migration des cellules étoilées. L'expression élevée du récepteur β de PDGF a été liée au développement de lésions hépatiques chez l'homme et les rongeurs (Davis, 1978). L'inactivation du récepteur β du PDGF dans les cellules étoilées diminue les lésions hépatiques et la fibrose dans les modèles murins de fibrose induite par le tétrachlorure de carbone (CCl₄) ou par la ligature de la voie biliaire principale (Kocabayoglu et al., 2015).

Le facteur de croissance du tissu conjonctif (CTGF) est une cytokine fibrogène exprimée à de faibles niveaux dans les foies normaux mais fortement induite dans le contexte de la fibrose (Tsuchida et Friedman, 2017). Le CTGF contribue à la formation de l'ECM, à la migration, à la prolifération et à l'adhésion, mais aussi à la survie cellulaire. L'expression de CTGF est contrôlée de manière transcriptionnelle par la voie de signalisation YAP/Taffazine (TAZ), fortement associée à la progression du cancer hépatique. Il a récemment été démontré que LATS2 (*Large tumor suppressor kinase*), le principal régulateur négatif de la voie YAP/TAZ, est O-GlcNAcylé. La O-GlcNAcylation de LATS2 inhibe son activité, en bloquant la liaison avec son partenaire MOB1 (*Monopolar spindle-one-binder 1*), activant ainsi la voie YAP/TAZ, favorisant ainsi la prolifération cellulaire (Kim et al., 2020).

Le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) est libéré par les cellules endothéliales hépatiques et les cellules étoilées lors de lésions hépatiques induisant la prolifération des cellules étoilées et l'angiogenèse. Le VEGF favorise la fibrogenèse mais semble également nécessaire à la réparation tissulaire et à la résolution de la fibrose (Yang L et al., 2014; Kantari-Mimoun et al., 2015). La protéine de spécificité 1 (Sp1), un des régulateurs transcriptionnels du VEGF, est activée par la phosphorylation par l'AKT (*protein kinase B*) (Pore et al., 2004). De plus, Sp1 est également O-GlcNAcylé (Majumdar et al., 2006). Il a été démontré que la production de VEGF-A induite par l'hyperglycémie est médiée par une augmentation de la O-GlcNAcylation du facteur de transcription Sp1 (Donovan et al., 2014).

3.3) O-GlcNAcylation et toxicité hépatique

L'OGT et la O-GlcNAcylation jouent un rôle important dans la réponse des hépatocytes aux agents toxiques hépatiques. En cas d'hépatite aigue sévère sur intoxication par l'acétaminophène, la désacétylation de MnSOD (*manganese superoxide dismutase*) par la SIRT3 (Sirtuine 3) entraîne une exacerbation des lésions hépatiques (Lu et al., 2011). En 2018, McGreal *et al.* ont démontré que la O-GlcNAcylation hépatique joue un rôle crucial dans l'hépatotoxicité induite par l'acétaminophène (McGreal et al., 2018). Leurs données indiquent que l'augmentation de la O-GlcNAcylation des protéines hépatiques entraîne une augmentation des lésions hépatiques et que l'inhibition de l'O-GlcNAcylation réduit les lésions hépatiques induites par l'acétaminophène. Les auteurs montrent que les souris avec une délétion sélective de l'OGT hépatocytaire présentent une réduction des lésions hépatiques par rapport aux souris témoins, après intoxication aigue à l'acétaminophène. De plus, lorsque les niveaux de O-GlcNAcylation hépatique sont augmentés en utilisant le TMG, un inhibiteur de l'OGA, l'hépatotoxicité de l'acétaminophène est exacerbée. Ces données suggèrent que la O-GlcNAcylation joue un rôle critique dans l'initiation des lésions hépatiques induites en cas de toxicité hépatique de l'acétaminophène.

Le principal mécanisme de protection observé chez les souris avec une délétion sélective de l'OGT hépatocytaire est qu'elles avaient une restauration des concentrations de GSH (glutathion) significativement plus rapide après une hépatite aigue suite à l'intoxication par l'acétaminophène. La mort cellulaire induite par l'acétaminophène dépend essentiellement du stress oxydant mitochondrial, de la formation de peroxy-nitrite, après l'épuisement initial du GSH et la formation d'adduits protéiques (Du et al., 2016). Le manque de GSH pendant cette phase initiale altère considérablement les défenses antioxydantes de la cellule. Par conséquent, fournir des substrats (comme la N-acétylcystéine) pour la synthèse de GSH au cours de cette phase précoce, accélère la récupération du GSH dans la cellule et protège le foie des lésions induites par l'acétaminophène (James et al., 2003; Knight et al., 2002; Saito et al., 2010).

Les enzymes impliquées dans la synthèse du GSH sont contrôlées par le récepteur nucléaire Nrf2 (Enomoto et al., 2001 ; Wild et Mulcahy, 2000), qui joue un rôle essentiel

dans la protection contre le stress oxydant hépatique. Fait intéressant, l'activité de Nrf2 est contrôlée par la O-GlcNAcylation (Chen et al., 2017; Tan et al., 2017), comme je l'ai décrit dans le chapitre « O-GlcNAcylation et stress oxydant ». Le traitement des souris contrôles avec du TMG conduit à une perte d'expression de Nrf2 tandis que les souris avec une délétion sélective de l'OGT hépatocytaire ont une augmentation de l'expression de Nrf2. La stabilisation de Nrf2 peut conduire à une induction rapide des gènes de biosynthèse du GSH, la reconstitution plus rapide des concentrations en GSH et limiter ainsi la progression des lésions hépatiques induites par l'acétaminophène. Cette étude a aussi révélé que l'augmentation de la O-GlcNAcylation hépatique, après un surdosage en acétaminophène, entraîne une augmentation et une prolongation de l'activation de JNK, ce qui corrèle avec des lésions hépatiques plus sévères.

3.4) O-GlcNAcylation et prolifération cellulaire

La O-GlcNAcylation joue un rôle majeur dans plusieurs processus, y compris la prolifération cellulaire. La dynamique de la O-GlcNAcylation est régulée lors de l'entrée des cellules dans le cycle cellulaire (**Figure 17**) et des modifications de la O-GlcNAcylation sont observées sur des protéines clés impliquées dans les réseaux du cytosquelette, la traduction, le repliement des protéines et la réplication de l'ADN (Drougat et al., 2012).

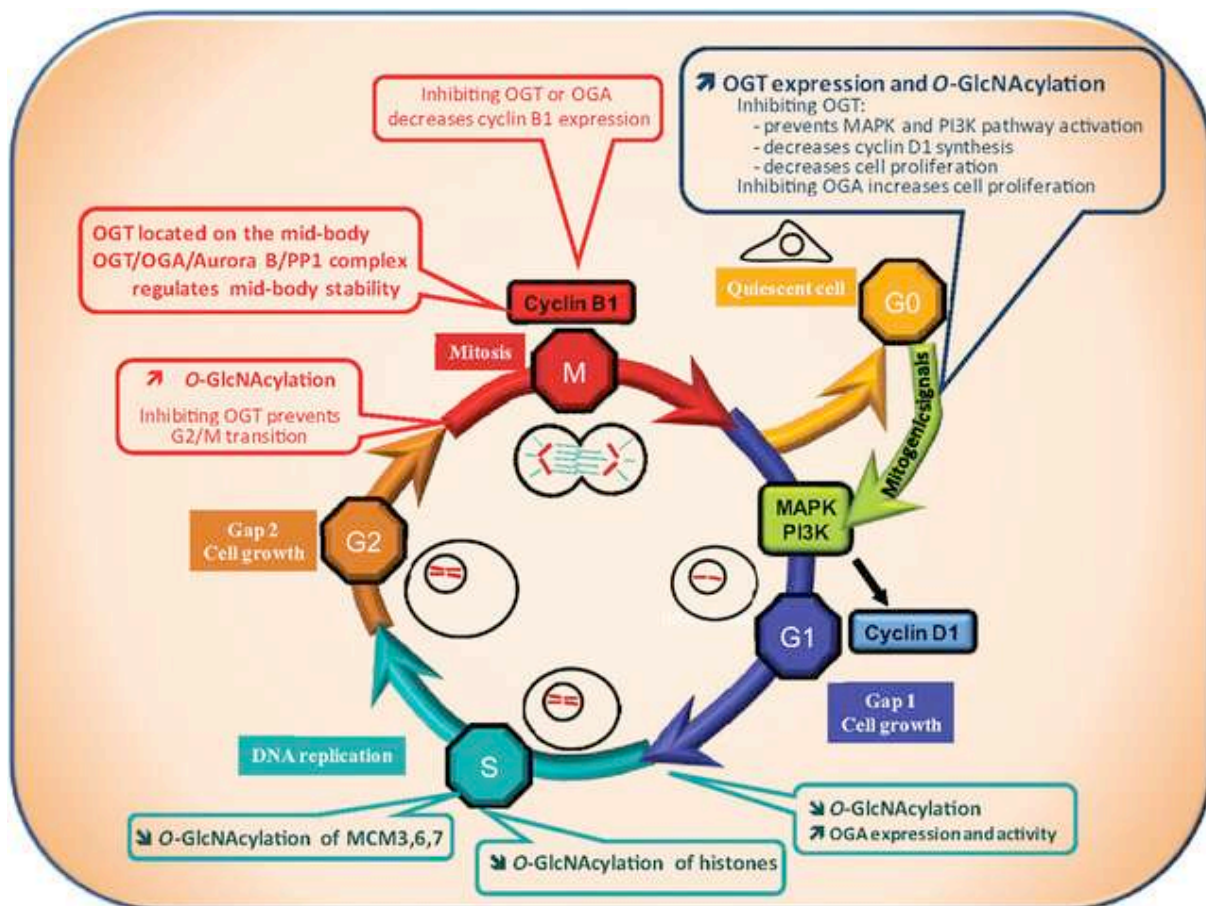


Figure 25 : O-GlcNAcylation et le cycle cellulaire

Le cycle cellulaire est divisé en quatre phases : la phase G1 (Gap1), au cours de laquelle la cellule se développe, suivie de la phase S de réplication de l'ADN, puis la phase G2 (Gap2) qui prépare la cellule à la phase de division proprement dite appelée phase M. La progression de la cellule à travers les différentes phases est très contrôlée : aux transitions G1/S et G2/M un point de contrôle existe pour s'assurer que l'ADN n'est pas endommagé avant et après sa réplication. Le point de contrôle G2/M contrôle également que la réplication est terminée avant la division de la cellule. Les niveaux de O-GlcNAcylation varient tout au long du cycle cellulaire, ce qui suggère qu'ils pourraient réguler ce processus. Les niveaux d'OGT et de O-GlcNAcylation augmentent lorsque les cellules quiescentes sont stimulées par des signaux mitogènes pour entrer dans le cycle cellulaire (transition G0/G1). Au contraire, l'activité OGA est augmentée lors de la transition G1/S, ce qui entraîne une diminution des niveaux globaux de O-GlcNAcylation. Au point de contrôle G2/M, une augmentation de la O-GlcNAcylation se produit. En accord avec ces observations, il a été démontré que la O-GlcNAcylation est cruciale pour l'entrée et la progression dans le cycle cellulaire. L'inhibition de l'OGT retarde l'activation des voies MAPK et PI3K (phosphoinositide 3-kinase) et l'entrée dans le cycle cellulaire, tandis que l'inhibition de l'OGA accélère le processus. Enfin, la O-GlcNAcylation pourrait participer au contrôle de la réplication de l'ADN puisqu'elle modifie plusieurs histones et trois protéines du MCM (Mini Chromosome Maintenance Complex) 3, 6 et 7 appartenant au complexe de pré-réplication de l'ADN. En conséquence, la dérégulation des processus de O-GlcNAcylation pourrait contribuer à perturber le contrôle du cycle cellulaire conduisant à une prolifération anarchique, mais aussi à l'accumulation de mutations de l'ADN, deux caractéristiques bien établies des cellules cancéreuses (D'après Fardini et al., 2013).

Les altérations du cycle de la O-GlcNAcylation entraînent des défauts mitotiques et une augmentation de l'aneuploïdie. Lanza *et al.* ont caractérisé l'effet de la réduction de l'activité de l'OGA sur la progression du cycle cellulaire dans des cellules HeLa (Lanza et al., 2016). Après la phase G1/S, les cellules inhibées pour l'OGA progressent normalement vers la phase S mais montrent cependant des défauts de sorties mitotiques. L'expression de la cycline A était augmentée dans les cellules inhibées pour l'OGA tandis que celle des cyclines B et D était réduite. La phosphorylation de la protéine du rétinoblastome était également augmentée dans les cellules inhibées pour l'OGA par rapport aux contrôles. À la phase M, les cellules inhibées pour l'OGA avaient des chromatides plus compacts que les cellules témoins et avaient un plus grand pourcentage de cellules avec des fuseaux multipolaires était observé.

Des altérations du cycle de la O-GlcNAcylation ont en particulier été impliqués dans des perturbations de la balance prolifération/différentiation.

Une étude récente a en effet étudié le rôle de la O-GlcNAcylation dans la régulation de la régénération hépatique après résection hépatique partielle en utilisant des souris témoins et des souris invalidées pour l'OGA et pour l'OGT hépatiques. Cette étude a révélé que la diminution de la O-GlcNAcylation conduit à une altération de la régénération hépatique après hépatectomie partielle (Robarts et al., 2022). Cela est dû à la perte de fonction de l'HNF4 α (*Hepatocyte nuclear factor 4 α*), un facteur de transcription nucléaire critique pour la différenciation et la fonction des hépatocytes (**Figure 26**).

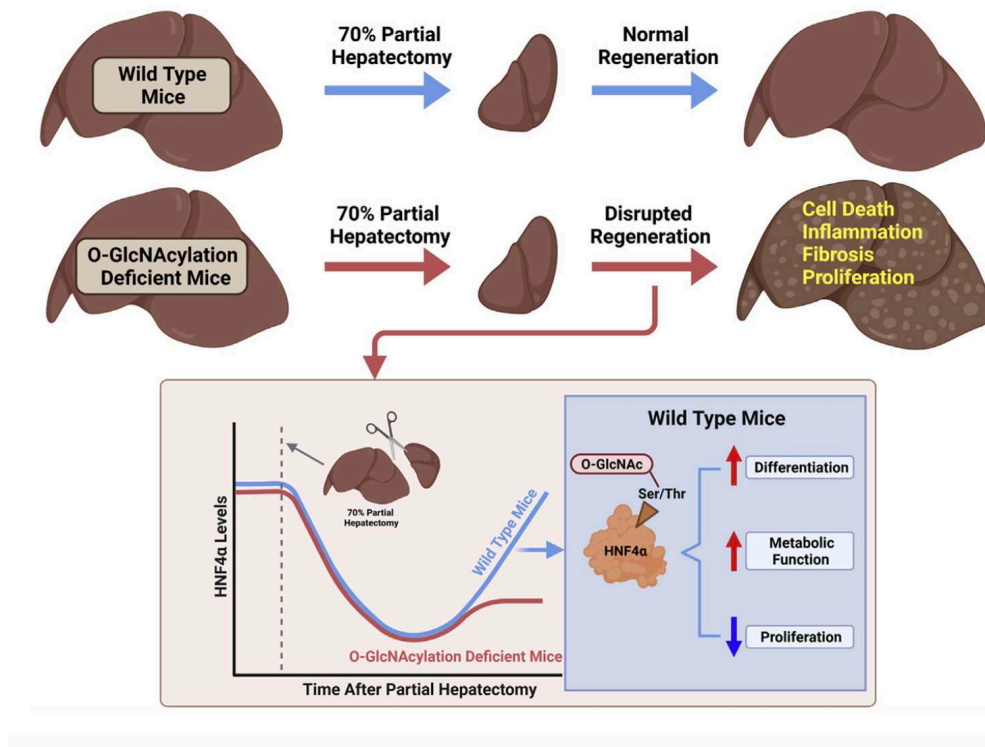


Figure 26 : La régénération hépatique est altérée en cas de diminution de la O-GlcNAcylation

La diminution de la O-GlcNAcylation entraîne une altération de la régénération hépatique après hépatectomie partielle. Cela est dû à la perte de fonction de HNF4 α , un facteur de transcription nucléaire critique pour la différenciation et la fonction des hépatocytes (D'après Roberts et al., 2022).

3.5) O-GlcNAcylation et cancer du foie

L'augmentation des niveaux de O-GlcNAcylation ou de l'expression de l'OGT est liée au développement de presque tous les types de cancer tels que le CHC (Xu et al., 2017), du côlon (Jiang et al., 2019) ou le cancer du sein (Barkovskaya et al., 2019) (**Figure 27**). L'analyse transcriptomique de 18 biopsies de CHC associées à la MASLD révèle une augmentation de l'expression de l'OGT ; une régulation positive a été également confirmée dans d'autres tissus tumoraux et dans des lignées cellulaires de CHC développé dans le contexte de la MASLD (Xu et al., 2017). Les cellules cancéreuses présentent une augmentation du niveau global de O-GlcNAcylation causée soit par une augmentation de l'OGT, soit par une diminution de la protéine OGA. L'augmentation de la O-GlcNAcylation dans les cellules cancéreuses favorise

l'absorption du glucose, le flux de glucose dans la voie des pentoses phosphates et la synthèse des lipides nécessaires au soutien de la prolifération cellulaire (Xu et al., 2017) (**Figure 28**).

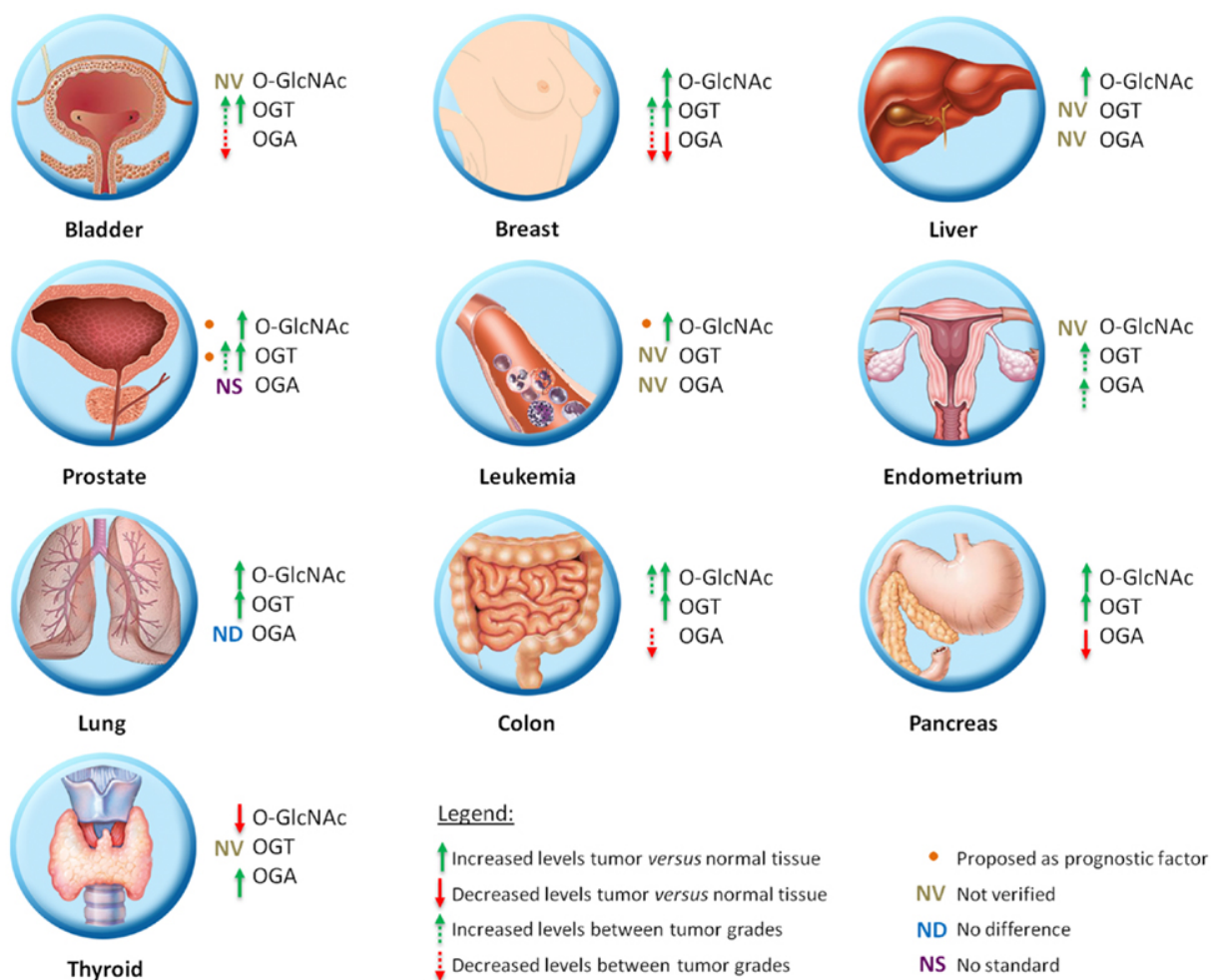


Figure 27 : Représentation schématique de la dynamique de la O-GlcNAcylation dans les différents tumeurs (D'après de Queiroz et al., 2014).

L'OGT joue un rôle dans la prolifération cellulaire par plusieurs mécanismes en modifiant des enzymes du métabolisme et/ou de la croissance cellulaire, la prolifération, la migration et l'invasion de cellules tumorales (Xu et al., 2017) (**Figure 28**). Ainsi dans des expériences de xénogreffes chez la souris nude, l'OGT favorise la croissance tumorale et les métastases pulmonaires (Xu et al., 2017) alors que l'inhibition de l'OGT inhibe la prolifération cellulaire (Xu et al., 2017, Wang L et al., 2018 ; Wang L et al., 2019). Il a également été démontré que l'augmentation de la O-GlcNAcylation favorise l'activité de l'AKT qui inhibe la dégradation protéosomale de la

cycline D1 *via* la phosphorylation et l'inhibition de GSK3 β (*glycogen synthase kinase 3 β*). L'accumulation de la protéine Cycline D1 favorise la prolifération et la migration des cellules (Diehl et al., 1998).

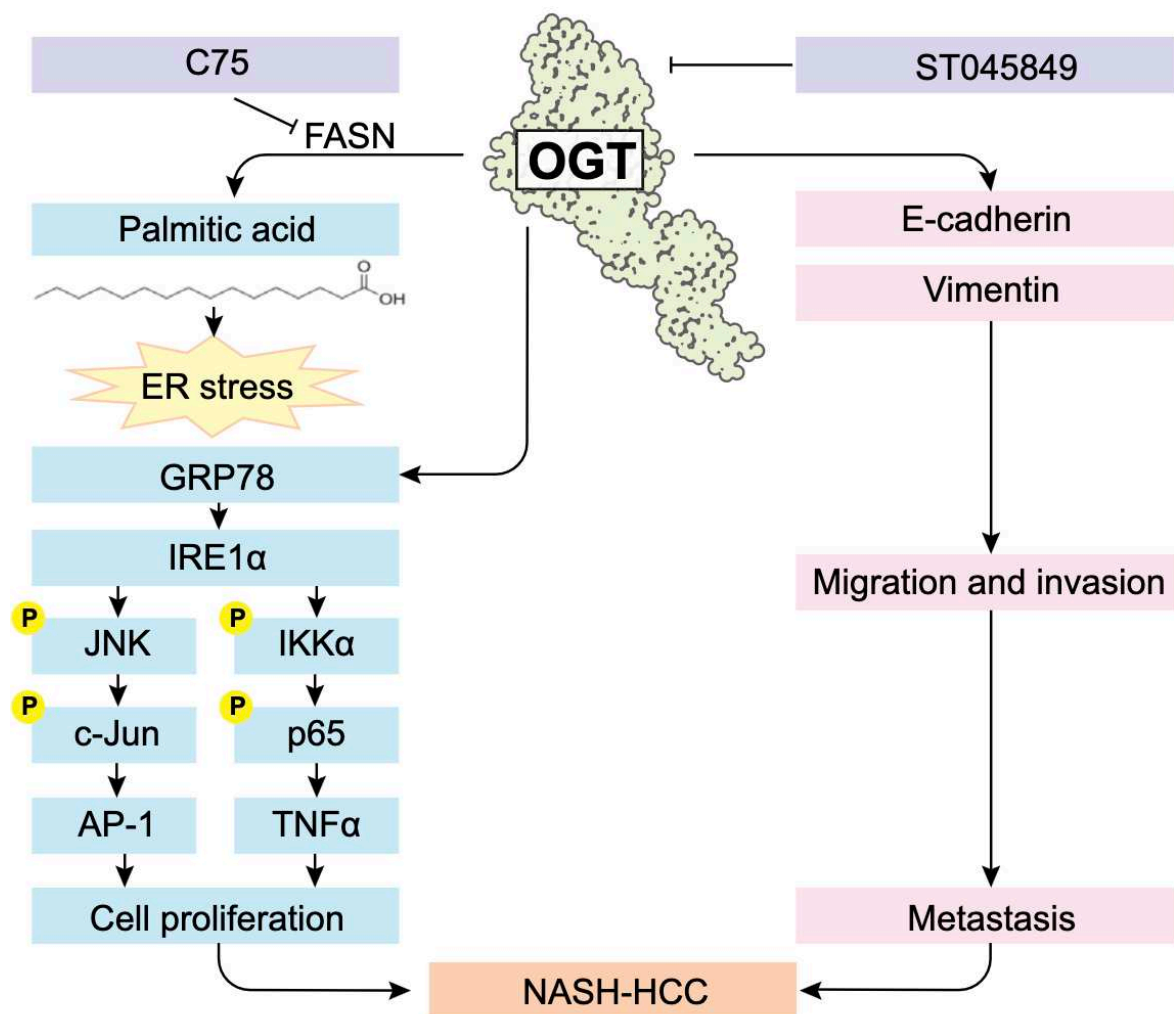


Figure 28 : Représentation schématique de l'effet oncogène de l'OGT dans le CHC associé à la MASLD.

L'OGT favorise la tumorigénèse hépatique en augmentant les concentrations intra-cellulaires d'acide palmitique, activant ainsi le stress du RE et les cascades de signalisation JNK et IKK α . En outre, l'OGT favorise le potentiel métastatique et invasif du CHC grâce à la modulation de la E-cadhérine et de la vimentine (D'après Xu et al., 2017).

La PKM2 (*pyruvate kinase musculaire 2*) est fortement exprimée dans les CHC associés à un mauvais pronostic. L'inhibition de PKM2 dans les cellules de CHC inhibe la prolifération cellulaire et induit l'apoptose *in vivo* et *in vitro* (Lv et al., 2018). La O-

GlcNAcylation *in vivo* et *in vitro* de PKM2, augmentée dans les cellules cancéreuses, inhibe son activité pyruvate kinase *via* la dissociation du tétramère actif, favorisant sa fonction dans la prolifération.

L'OGT contrôle également la prolifération cellulaire par l'activation de HDAC1 (*Histone Deacetylase 1*). La O-GlcNAcylation de HDAC1 est augmentée dans le CHC chez l'homme (Zhu et al., 2016), suggérant qu'elle pourrait jouer un rôle important dans la pathogenèse tumorale. La O-GlcNAcylation de HDAC1 (Thr114 et Ser 263) favorise la prolifération cellulaire dans le CHC, *via* l'inhibition de p21, une protéine clé dans la régulation du cycle cellulaire (Zhu et al., 2016). De plus, l'expression de YB-1 (*Y-box binding protein 1*), une protéine impliquée dans la régulation de la transcription et de la traduction *via* l'épissage de l'ARNm dans le cytoplasme, est élevée dans les cellules de CHC. Fait intéressant, l'augmentation de l'expression de YB-1 est corrélée à des niveaux élevés d'OGT et d'O-GlcNAcylation, et plusieurs résidus modifiés par O-GlcNAcylation ont été identifiés sur la protéine YB-1. Seule la O-GlcNAcylation de YB-1 sur Thr126 influence positivement la phosphorylation et la fonction de YB-1, se traduisant par une prolifération cellulaire accrue, favorisant la progression du CHC (Liu et al., 2016).

Une autre voie impliquée dans la carcinogenèse où la O-GlcNAcylation joue un rôle est la voie Hippo-YAP. La voie Hippo-YAP est un suppresseur de croissance qui participe au contrôle de la taille des organes au cours du développement et de la croissance tumorale à l'âge adulte. La protéine YAP est régulée positivement dans le CHC et son expression est corrélée à l'induction de la migration cellulaire (Shi et al., 2018). Les souris avec une délétion sélective de YAP hépatocytaire présentent une hépatomégalie avec de la stéatose macrovésiculaire, mais également de la fibrose hépatique avancée (Zhang et al., 2010). La protéine YAP est également modulée par O-GlcNAcylation sur la Ser109, favorisant ainsi son activité dans la prolifération cellulaire et la tumorigenèse (Peng et al., 2017).

La O-GlcNAcylation régule aussi l'activité de c-MYC. c-MYC est un facteur de transcription connu pour contrôler la prolifération cellulaire, le cycle cellulaire, la différenciation, l'apoptose et le métabolisme (Chen, Liu et Qing, 2018). c-MYC favorise la tumorigenèse hépatique *in vitro*, *in vivo* chez la souris, et dans le cancer humain. c-MYC est également O-GlcNAcylé sur la Thr58, ce qui réduit sa phosphorylation sur

Ser62 et sa dégradation (Makwana et al., 2019). L'augmentation du niveau de O-GlcNAcylation dans le CHC pourrait conduire à la stabilisation de c-MYC et à l'induction de l'effet tumorigène.

Une autre voie impliquée dans le développement du CHC est la voie de la β -caténine. La β -caténine est connue pour être communément mutée et constitutivement activée dans le CHC (Wu et al., 2020). Il a été démontré que la β -caténine est O-GlcNAcyllée sur au moins 4 résidus à l'extrémité N-terminale, ce qui augmente sa stabilité et donc son activité (Olivier-Van Stichelen et al., 2014).

Les données rapportées jusqu'à présent sont en faveur d'une augmentation de la O-GlcNAcylation dans la tumorigénèse, cependant une étude récente a démontré que les souris invalidées pour l'OGT hépatocytaire ont un risque accru de développer un CHC suite au traitement par diethylnitrosamine, avec une augmentation de l'inflammation et de la fibrose et de la signalisation YAP. Parallèlement, les souris invalidées pour l'OGA hépatocytaire avec une O-GlcNAcylation hépatique augmentée ne développent pas de CHC suite au traitement par diethylnitrosamine. Une perte progressive de O-GlcNAcylation a été observée chez les patients ayant un CHC (Robarts et al., 2023) (**Figure 29**). Ces données suggèrent que si l'augmentation de la O-GlcNAcylation joue un rôle crucial dans le développement et la progression du CHC, un niveau optimal doit être maintenu ; l'absence de O-GlcNAcylation pouvant également conduire à des altérations aboutissant au développement du CHC.

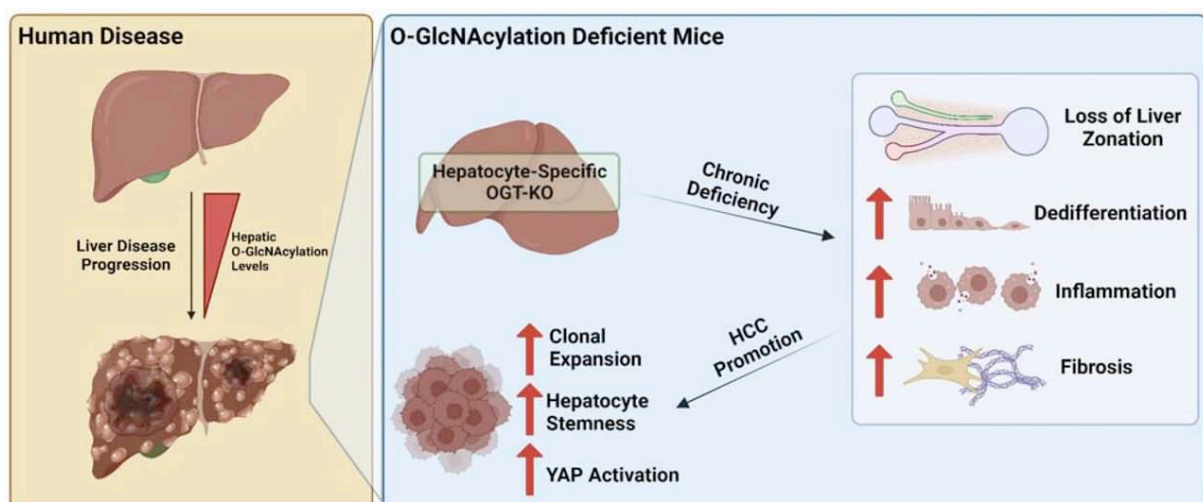


Figure 29 : Conséquences d'une réduction de la O-GlcNAcylation hépatocytaire dans la carcinogénèse hépatique (D'après Robarts et al., 2023).

Chapitre 3 : les points importants

1. L'OGT et la O-GlcNAcylation jouent un rôle important dans la régulation de la régénération et de l'homéostasie hépatique
2. Une augmentation de la O-GlcNAcylation a des conséquences dans le développement et l'aggravation des lésions hépatiques dans la MASLD et le CHC.

Contexte et objectifs de l'étude

Comme mentionné dans l'introduction, la O-GlcNAcylation est une modification post-traductionnelle dynamique et réversible contrôlée par l'activité de seulement deux enzymes, la O-GlcNAc transférase (OGT) et la O-GlcNAcase (OGA). Ces deux enzymes interviennent dans le cycle dynamique de la O-GlcNAcylation sur une grande variété de protéines cytosoliques, nucléaires et mitochondriales d'une manière sensible aux nutriments et au stress (Zhang et al., 2019).

En conséquence, il a été proposé que la O-GlcNAcylation fonctionne comme un capteur de nutriments et de stress régulant les processus cellulaires allant de la transcription et de la traduction à la transduction du signal et au métabolisme. La perturbation de l'homéostasie de la O-GlcNAcylation a été impliquée dans la physiopathologie de plusieurs maladies, notamment le cancer, le diabète ou la neurodégénérescence (Nie et Yi, 2019). Notre laboratoire a précédemment rapporté que la O-GlcNAcylation des effecteurs clés du métabolisme contribue de manière significative à la gluco-lipototoxicité dans le foie (Guinez et al., 2011 ; Kuo et al., 2008) et dans les cellules β pancréatiques (Fardini et al., 2014 ; Filhoulaud et al., 2019).

Alors que les fonctions cellulaires de la O-GlcNAcylation émergent, on sait peu de choses sur les mécanismes précis de la façon dont l'enzyme OGT détecte les signaux environnementaux pour induire des changements moléculaires et physiologiques. Une étude publiée en 2019 a suggéré que l'OGT agit comme un suppresseur de la nécroptose des hépatocytes (une forme spécifique de nécrose régulée) et que l'inhibition de l'OGT dans le foie des souris entraîne le développement d'une fibrose hépatique (Zhang et al., 2019).

Dans ce contexte, le premier objectif de ma thèse a été de déterminer plus précisément les conséquences d'une délétion ciblée de l'enzyme OGT dans les hépatocytes *in vivo* et à explorer l'effet d'un changement nutritionnel sur le phénotype hépatique. En utilisant des souris avec une inhibition constitutive et ciblée de l'OGT dans les hépatocytes (OGT^{LKO}), notre étude révèle que l'OGT est essentielle à l'homéostasie du foie.

Le second objectif de mon travail de thèse a été de caractériser un modèle murin original présentant une délétion inducible de l'OGT hépatocytaire (OGT^{INDLKO}). La caractérisation de ce modèle nous a permis de démontrer que le rôle de l'OGT dans le maintien de l'homéostasie hépatique est indépendant du développement.

Enfin, afin de transposer nos études chez l'homme, nous avons analysé les niveaux d'expression de l'OGT et de la O-GlcNAcylation hépatiques dans le foie d'une population de patients ayant subi une chirurgie bariatrique pour une obésité morbide (Cohorte Abos-CHU de Lille). Nous avons complété ces informations par une analyse informatique de données obtenues du foie des patients (hommes et femmes) ayant une MASLD histologiquement prouvée (Cohorte CHU de Toulouse).

Objectif n° 1 : Caractérisation du phénotype des souris présentant une délétion constitutive de l'OGT dans le foie

Matériels et méthodes

Génération de souris OGT^{LKO}

Des souris avec une délétion constitutive de l'OGT hépatocytaire (OGT^{LKO}) et des témoins floxés (OGT^{LWT}) ont été générés en croisant des souris transgéniques albumine-Cre, *Ogt*^{F/Y} avec des souris *Ogt*^{F/F}. Les souris *Ogt*^{F/F} sont floxées sur les deux côtés des exons 6-7 codant pour les acides aminés 206 et 232. Ces souris ont été obtenues auprès du laboratoire Jackson (JAX stock #00486).

Animaux et régimes

Toutes les procédures animales ont été réalisées conformément aux directives Françaises pour le soin et l'utilisation des animaux de laboratoire (Accords d'autorisation animale #9723, #19226 et #33226 du Comité d'éthique de l'Université Paris Cité). Toutes les souris (des mâles et des femelles ont été utilisés, et le sexe des animaux est indiqué dans chaque légende de figure) ont été hébergées dans une animalerie avec un cycle lumière/obscurité de 12 heures. Toutes les souris ont eu libre accès à l'eau et à un régime alimentaire standard (régime standard (SD) : 69 % de glucides, 4 % de lipides, 26 % de protéines ; SAFE #A03). Pour les expériences de réversion nutritionnelle du phénotype hépatique, des souris OGT^{LWT} et OGT^{LKO} ont été nourries au sevrage pendant 1 mois avec un régime pauvre en glucides et riche en graisses (LCHF : 21 % de glucides, 60 % de lipides, 19 % de protéines ; SSNIF #E15742) ou un régime cétogène (KD : 11 % de glucides, 94 % de lipides, 5 % de protéines ; SSNIF #E15149).

Glycémie, concentrations sériques des cytokines et des enzymes hépatiques

La glycémie a été mesurée dans le sang total à l'aide d'un glucomètre Accu-Check (Roche). La concentration des cytokines sériques a été analysée à l'aide du kit murin V-PLEX panel pro-inflammatoire 1 (Mesoscale, K15048D). L'alanine aminotransférase (ALAT), l'aspartate aminotransférase (ASAT), la lactate déshydrogénase (LDH), la phosphatase alcaline (PAL) et la bilirubine totale et conjuguée sériques ont été mesurées à l'aide d'un appareil automatisé Monarch (Laboratoire de Biochimie, Faculté de Médecine Bichat, France).

Extractions des ARN, transcription inverse et qPCR

Le tissu hépatique congelé a été réduit en poudre et environ 15 mg de poudre de foie ont été utilisés pour l'extraction des IARN à l'aide du système d'isolement d'ARN total (Promega, Z3101). Les échantillons d'ARN ont été retro-transcrits et l'ADN complémentaire (ADNc) a été mesuré par qPCR (LightCycler480 SYBR Green I Master, Roche) à l'aide des amorces décrites dans le tableau S4 (voir Article). L'expression génique a été normalisée par rapport à l'expression des niveaux d'ARNm de la protéine de liaison TBP (TATA-box) ou GAPDH (Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase).

Extraction des protéines et analyses par western blot

Le tissu hépatique entier a été lysé dans un tampon de lyse (Tris HCl 20 mM [pH 7,5], NaCl 150 mM, EDTA 5 mM, NaF 50 mM, NaP 30 mM, 1 % Triton X-100, un cocktail inhibiteur de protéase sans EDTA [Roche, 4693132001], orthovanadate 1 mM, Thiamet -G 10 µM [Sigma, SML0244]). Le western blot a été réalisé en utilisant 30 µg de lysat. Les anticorps utilisés sont les suivants : anti-OGT (Sigma, SAB4200311), anticorps anti-O-linked N-acetylglucosamine (RL2, ab2739), anti-GAPDH (Santa Cruz, sc-25778), anti-β-actine (CST # 4970), anti-HSP 90 (CST # 4874), anti-CycA2 (Santa Cruz, sc-596), anti-CycD1 (CST #2978), anti-PCNA (CST #2586), anti-p62 (Enzo Life Sciences, BML-PW9860-0100), anti- p-p62 (CST #14354), anti-CHOP (CST #5554), anti-γH2AX (CST #2577), anti-H2AX total (CST #7631), anti-Cleaved Caspase-3 (CST #9661), anti-MLKL (ab172868), anti-RIPK3 (orb74415).

L'analyse semi-quantitative a été réalisée à l'aide du logiciel ChemiDoc (Bio-Rad).

Préparation et coloration des tissus

Des foies fixés (4 % PFA, 24 heures à 4 °C) ont été inclus dans de la paraffine et coupés en lames de 7 µm d'épaisseur. Après déparaffinage et réhydratation, les lames ont été colorées avec de l'hématoxyline-éosine (HE), du rouge Sirius et immunomarquées avec l'anticorps αSMA pour la détection de la fibrose. Dans le cas de l'immunomarquage, la récupération de l'antigène a été effectuée dans un tampon citrate pendant 10 min à 95°C et traitée avec un réactif bloquant la peroxydase (Sigma, H1009). Les lames ont été perméabilisées avec 0,01 % de Tween20 et l'antigénicité

non spécifique a été bloquée avec 2 % de BSA et 2 % de sérum, provenant de l'espèce chez laquelle l'anticorps secondaire a été produit. Les anticorps primaires utilisés sont les suivants : anti-OGT (Abcam, ab96718), Ki67 (ThermoFisher, MA5-14520), HNF4 α (Santa Cruz, sc-6556), SOX9 (EMD millipore, ab5535) et Krt19 (Abcam, ab52625), TUNEL (EMD Millipore S71000), F4/80 (CST#70076), MDA (Abcam, ab27642), α SMA (NB600-531) Les anticorps secondaires conjugués à la HRP (*Horseradish peroxidase*) ont été révélés par incubation avec un substrat DAB (Dako, K3468), co-colorés avec de l'hématoxyline (Laboratoires Vector, H-3404) et montés avec un milieu de montage VectaMount™ (laboratoires Vector, H-5000).

L'analyse des images a été réalisée avec le logiciel QuPath.

Évaluation de la polyploïdie

Pour analyser la polyploïdie, des coupes de foie ont été colorées avec Hoechst 33342. Un ensemble de données avec la taille et la circularité des noyaux a été ensuite quantifié à l'aide de QuPath. En utilisant le logiciel R, un ensemble de données contenant uniquement des noyaux d'hépatocytes a été généré en fonction de la taille (> 30 μ m) et de la circularité (> 0,8) des noyaux. La ploïdie nucléaire a été évaluée automatiquement, par une macro spécifique développée avec le logiciel Image J, comme décrit précédemment (Gentric et al., 2015). Enfin, la polyploïdie hépatocytaire a été présentée comme le rapport entre le nombre de noyaux polyploïdes et le nombre total d'hépatocytes.

Analyse des lipides neutres du foie

Les lipides hépatiques ont été extraits d'échantillons de foie comme précédemment décrit (Bligh EG, Dyer WJ., 1959). Brièvement, un morceau de 50 mg de foie a été homogénéisé dans du méthanol/EGTA 2 : 1 (v/v) (5 mM) et les lipides de 2 mg de foie ont été extraits dans un mélange de méthanol, de chloroforme et d'eau (2,5 : 2,5 : 2, v/v/v) en présence d'étalons internes (glycériltridonadécanoate, stigmastérol et cholestérol heptadécanoate). Les triglycérides, le cholestérol libre et les esters de cholestérol ont été analysés par chromatographie en phase gazeuse sur un système Focus Thermo Electron en utilisant une colonne capillaire de silice fondue Zebron-1 Phenomenex (5 m, 0,32 mm i.d., 0,50 μ m d'épaisseur de film). La température du four était programmée de 200 à 350°C à une vitesse de 5°C/min, et le gaz porteur était de

l'hydrogène (0,5 bar). L'injecteur et le détecteur étaient à 315°C et 345°C, respectivement.

Analyse des acides gras hépatiques

Les espèces moléculaires d'esters méthyliques d'acides gras (FAME) ont été extraites d'un équivalent de 1 mg de tissu hépatique en présence d'étalons internes de triheptadécanoate de glycéryle (2 µg). L'extrait lipidique a été trans-méthylé avec 1 ml de BF₃ dans du méthanol (solution à 14 % ; Sigma) et 1 ml d'heptane pendant 60 min à 80°C et évaporé à sec. Les FAME ont été extraits avec de l'heptane/eau (2 : 1). La phase organique a été évaporée à sec et dissoute dans 50 µl d'acétate d'éthyle. Un échantillon (1 µl) de FAME totaux a été analysé par chromatographie gaz-liquide (système Clarus 600 Perkin Elmer, avec colonnes capillaires en silice fondue Famewax RESTEK, 30 m × 0,32 mm i.d., 0,25 µm d'épaisseur de film). La température du four a été programmée pour augmenter de 110°C à 220°C à une vitesse de 2°C/min, et le gaz porteur était de l'hydrogène (7,25 psi). Les températures de l'injecteur et du détecteur étaient respectivement de 225°C et 245°C.

Analyse de la sphingomyéline hépatique et des céramides

Les lipides ont été extraits du foie (1 mg) comme décrit par Bligh et Dyer (Bligh et Dyer, 1959) dans du dichlorométhane/méthanol (2 % d'acide acétique)/eau (2,5 : 2,5 : 2 v/v/v). Des standards internes ont été ajoutés (Cer d 18 : 1/15 : 0, 16 ng ; SM d18 : 1/12:0, 16 ng). La solution a été centrifugée à 1500 rpm pendant 3 min. La phase organique a été recueillie et séchée sous azote, puis dissoute dans 50 µl de MeOH. Les solutions d'échantillons ont été analysées avec un système UPLC Agilent 1290 couplé à un spectromètre triple quadripôle G6460 (Agilent Technologies). Le logiciel MassHunter a été utilisé pour l'acquisition et l'analyse des données. Une colonne Kinetex HILIC a été utilisée pour les séparations LC. La température de la colonne a été maintenue à 40°C. La phase mobile A était l'acétonitrile ; et B était du formiate d'ammonium 10 mM dans de l'eau à pH 3,2. Le gradient était le suivant : de 10% à 30% B en 10 min ; 100% B de 10 à 12 min ; puis de nouveau à 10 % de B à 13 min pendant 1 min pour rééquilibrer avant la prochaine injection. Le débit de la phase mobile était de 0,3 ml/min et le volume d'injection était de 5 µl. Une source d'électronébulisation a été utilisée en mode ions positifs. Le gaz de collision était de l'azote. La tension de l'aiguille a été fixée à +4000 V. Plusieurs modes de balayage ont

été utilisés. Tout d'abord, pour obtenir les masses naturellement différentes de différentes espèces, nous avons analysé des extraits lipidiques cellulaires avec un balayage d'ions précurseurs à 184 m/z et 264 m/z pour SM et Cer, respectivement. Ensuite, les transitions SRM correspondantes ont été utilisées pour quantifier différentes espèces de phospholipides pour chaque classe. Deux acquisitions de 9 MRM ont été nécessaires, du fait des différences importantes entre les classes de phospholipides. Les données ont été traitées avec le logiciel d'analyse quantitative QqQ (vB.05.00) et qualitative (vB.04.00).

Analyse transcriptomique par microarray

L'extraction de l'ARN du foie a été effectuée comme mentionné précédemment et son intégrité a été vérifiée à l'aide de Bioanalyzer. La normalisation des données a été réalisée par la plateforme de transcriptomique de l'Institut Cochin. Le profilage de l'expression génique a été réalisé sur 5 échantillons biologiques par condition. Après validation de la qualité de l'ARN avec le Bioanalyzer 2100, l'ARN a été transcrit en suivant le protocole (GeneChip® WT Plus Reagent Kit, Thermofisher). Après fragmentation et marquage à la biotine, le cADN a été hybridé sur GeneChip® Clariom S Mouse (Thermofischer) et scanné à l'aide du GCS3000 7G. Les images ont été analysées avec le logiciel Expression Console (Thermofischer). Les données brutes ont été normalisées à l'aide de l'algorithme robuste multipuce (RMA). Les statistiques et la normalisation RMA ont été réalisées à l'aide du logiciel TAC4.0 (Thermofisher). Une analyse en aval a été effectuée pour identifier les gènes exprimés de façon différentielle (DE) par rapport aux conditions contrôle. Les gènes DE ont été sélectionnés sur la base de la valeur de p corrigée (valeur de p du FDR < 0,05) et du facteur de changement d'OGT^{LKO} par rapport aux témoins (gènes up-régulés : changement de facteur ≥ 2 , gènes régulés à la baisse : facteur de changement ≤ -2). Le diagramme de Venn a été réalisé à l'aide de l'outil interactif "Venny 2.1.0". Les gènes régulés à la hausse et à la baisse ont été annotés à l'aide de l'ensemble de gènes Reactome. L'enrichissement fonctionnel de voies spécifiques dans l'ensemble de gènes a été réalisé à l'aide du test exact de Fisher et de la correction FDR. Les voies ont été considérées comme significativement enrichies à un FDR < 0,05. Le logiciel statistique R v.3.6.2 et les packages R ont été utilisés pour l'analyse bioinformatique et la représentation graphique. Les parcelles de volcan ont été représentées à l'aide du package "Enhanced Volcano". Les cartes thermiques ont été

représentées à l'aide du package "pheatmap", où la ligne de distance de regroupement de corrélation a été appliquée.

Isolement et culture primaire d'hépatocytes

Des souris âgées de quatre semaines ont été anesthésiées par injection intra-péritonéale d'une solution de kétamine-xylazine 10 : 1. Le foie a été perfusé par la veine porte avec la solution saline équilibrée de HANK, suivie d'une perfusion de collagénase. La viabilité cellulaire a été calculée par test d'exclusion au bleu trypan à l'aide d'une chambre Malassez etensemencée dans des plaques 6 puits à une concentration de 500 000 cellules par puits. Les cellules ont étéensemencées dans du milieu M199 contenant 5 mM de glucose (Thermofisher, #11150059) additionné de 100 µg/mL de streptomycine, 100 unités/mL de pénicilline, L-glutamine (2 mM), 0,1 % Bovine sérum albumine, 2,5 % Nu-sérum (BD Bioscience, Cat#355104) et la dexaméthasone (100nM, Novo Nordisk). Pour le dosage du glutathion réduit/glutathion oxydé (GSH/GSSG), les hépatocytes ont étéensemencés dans des plaques 96 puits à une concentration de 15 000 cellules par puits. Vingt-quatre heures après l'ensemencement, le rapport GSH/GSSG a été mesuré à l'aide du kit de dosage GSH/GSSG-Glo (Promega, Madison, WI) conformément aux instructions du fabricant. Des expériences avec la Staurosporine ont été réalisées en ensemencant des hépatocytes dans des boîtes de 6 cm² à une concentration de 1,5 x 10⁶ cellules par boîte. Vingt-quatre heures après l'ensemencement, les cellules ont été traitées avec 10 µM de staurosporine (Sigma, S4400) et récoltées 0, 2, 4 et 8 heures après l'ensemencement pour l'extraction des protéines. Pour les expériences avec la thapsigargine, 24 heures après l'ensemencement, les cellules ont été traitées avec 0,3 µM de thapsigargine (Sigma, T9033) pendant 24 heures. Le niveau total de peroxydation lipidique a été analysé par des tests Bodipy 581/591 basés sur la cytométrie en flux (Molecular Probes), comme recommandé par le fabricant. Quarante-huit heures après l'ensemencement, les cellules ont été traitées avec 5 µM de BODIPY pendant 30 minutes à 37°C. Les cellules ont ensuite été récupérées et lavées avec du PBS. Pour chaque expérience, 20 000 événements ont été acquis par cytométrie en flux à l'aide du Novocyte Cytometer (Ozyme). Les données ont été analysées à l'aide du logiciel Novoexpress. Les niveaux totaux de ROS ont été mesurés à l'aide du réactif Cellrox Deep red (Thermofisher) à une concentration finale de 2,5 µM, puis incubés pendant 30 minutes à 37 °C. Les données ont été analysées à l'aide du logiciel Novoexpress. Pour l'activité ARE-luciférase, les cellules ont été transfectées avec un

rapporteur 3xARE-luciférase (Wang et al., 2006) et un plasmide β -galactosidase en utilisant Lipofectamine 2000 et le milieu OptiMEM. Après une nuit d'incubation, le milieu a été remplacé par du glucose faible (5 mM) pendant 24 heures. Le dosage de la luciférase a été réalisé après la lyse cellulaire. Des dosages de β -galactosidase ont été effectués pour la normalisation de l'activité 3xARE-luciférase.

Microscopie de génération de la deuxième harmonique (SHG) pour la quantification de la fibrose

Les images SHG ont été acquises avec un microscope multiphoton Leica DIVE (Leica microsystems Gmbh, Wetzlar, Allemagne) couplé à une source laser Coherent Discovery (Coherent Inc., Santa Clara, CA, USA). Cinq champs de vision ont été acquis à partir de coupes de foie de 7 μ m d'épaisseur enrobées de paraffine. Les images d'auto-fluorescence et SHG excitées à deux photons ont été acquises via un objectif d'immersion dans l'eau Leica Microsystems HCX IRAPO 25x / 0,95 en réglant le laser à 1040 nm à puissance constante et des tubes photomultiplicateurs et des détecteurs hybrides ont été utilisés à 800 V constant et 80% de gain respectivement permettant direct comparaison des valeurs d'intensité SHG. Une impulsion laser polarisée circulairement a été envoyée à l'objectif du microscope pour exciter de manière isotrope la tranche quelle que soit l'orientation du collagène fibrillaire. Pour quantifier le SHG, le microscope a été calibré à l'aide d'une section de foie témoin non fibrotique. Le score SHG a été effectué à l'aide d'un macro ImageJ (<http://imagej.nih.gov/ij/>), comme décrit précédemment (Guilbert et al., 2010).

Analyse des acides biliaires

Les acides biliaires ont été extraits du plasma et du contenu caecal par précipitation au méthanol glacé. Les espèces des acides biliaires ont été quantifiées par chromatographie liquide à haute performance (UFLC-XR dispositif, Shimadzu) couplée à la spectrométrie de masse en tandem (Système hybride QTRAP5500, équipé d'un Turbo VTM ion source, Sciex) à l'aide de 5-acides biliaires deutérés (acide d4-cholique [CA], d4-acide glycocholate, acide d4-taurocholique, d4-CDCA, d4-acide glycochenodésoxycholique) comme étalons internes. Les CA, CDCA, l'acide ursodésoxycholique (UDCA), l' α MCA et le β MCA sont des acides biliaires primaires chez la souris. Le DCA, le LCA, le ω MCA et l'acide hyodésoxycholique sont des acides biliaires secondaires chez la souris.

Analyses statistiques

Toutes les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide de Prism GraphPad Software Inc. Le nombre d'expériences indépendantes réalisées et le test statistique utilisé sont indiqués dans la légende de chaque figure.

Résultats

Dans ce premier chapitre des résultats je présenterai 1) un résumé en Français des données publiées dans l'article « *OGT acts a critical nutritional node for the control of liver homeostasis* » (JHEP Reports) et 2) des résultats complémentaires plus détaillés avec des figures originales sur l'analyse précoce des souris OGT^{LKO}, sur le rôle des acides biliaires et de la signalisation FXR, sur l'analyse à long terme du phénotype des souris OGT^{LKO}.

1) Résumé en Français des résultats publiés dans l'article « *OGT acts a critical nutritional node for the control of liver homeostasis* »

Nous avons démontré que l'OGT joue un rôle très important dans le maintien de l'homéostasie hépatique.

A quatre semaines de vie, les souris OGT^{LKO} présentent une augmentation de l'expression d'un marqueur de stress du RE et de l'apoptose (CHOP) et une inflammation exacerbée avec une augmentation de l'expression des marqueurs d'inflammation (CJun, pJNK (**Figure S5A du papier**), *Tnfa*, *Mcp1* et *Ccl5* (**Figure 1I du papier**)), associée à une augmentation de la cytokine circulante sérique CxCl1 (**Figure 1J du papier**). Nous avons aussi confirmé que l'expression des gènes impliqués dans la réponse au stress oxydant (*Nqo1*, *Nrf2*, *Gsta1* et *Gstm3*) (**Figure S5B du papier**) était augmentée dans le foie des souris OGT^{LKO}, associée à une activation de la prolifération hépatique et une fibrose hépatique modérée (**Figure 1E du papier**). L'analyse histologique hépatique a révélé une ballonnisation hépatocellulaire et une fibrose initiale ainsi qu'une activation des fibroblastes chez les souris OGT^{LKO} par rapport aux souris OGT^{LWT} (**Figure 1E du papier**). De plus, une coloration positive pour TUNEL, Ck7 (Cytokeratin7) et SOX9 (*SRY-Box Transcription Factor 9*) dans le foie de souris OGT^{LKO} a révélé la présence de lésions hépatiques émergentes, de l'apoptose, une réaction ductulaire et une activation des cellules progénitrices hépatiques (**Figure 1E du papier**). L'ensemble de ces résultats révèlent que la délétion hépatique de l'OGT induit une inflammation, un stress du RE, un stress

oxydant, une augmentation de l'apoptose, une fibrose modérée et des signes précoces d'atteinte hépatique à 4 semaines de vie.

Nous avons poursuivi la caractérisation de notre modèle avec une analyse du phénotype hépatique à 8 semaines de vie. Au sacrifice, nous avons observé une détérioration du phénotype hépatique chez les souris OGT^{LKO} avec un foie dysmorphique, des contours irréguliers et des nodules hépatiques ainsi qu'une splénomégalie (**Figures 2B et 2C du papier**). L'augmentation du poids de la rate était en accord avec une inflammation hépatique exacerbée et une probable hypertension portale (**Figure 2A du papier**). Une augmentation significative des marqueurs de fibrose (α SMA, *Col3a1*, *Col6a1*) a également été observée (**Figure 2D du papier**), corroborant la coloration positive pour le rouge Sirius et l'immunomarquage α SMA, suggérant une fibrose hépatique avancée et l'activation des fibroblastes (**Figure 2G du papier**). A 8 semaines de vie, nous avons confirmé l'augmentation de l'expression des marqueurs de l'inflammation (**Figure 2J du papier**), du stress oxydant (**Figure S5B du papier**), du stress du RE (**Figures S5A et S5B du papier**) et de la prolifération hépatique (**Figures 31A et 31B**) avec activation des cellules progénitrices hépatiques (**Figure 31C**), une augmentation de l'expression des *Ck7* et *Ck19* (marqueurs de réaction ductulaire) et une réduction de l'expression de *Hnf4 α -P1* (régulateur majeur de l'identité des hépatocytes) (**Figure 31D**). De manière parallèle, les souris OGT^{LKO} présentent également une augmentation significative des concentrations circulantes des marqueurs de cytolyse (ALAT et ASAT) et de cholestase (PAL) (**Figures 2I et S3E du papier**). Alors que l'expression de RIPK3, une protéine clé de la nécroptose, n'était pas significativement augmentée dans le foie des souris OGT^{LKO}, l'expression de MLKL, un autre marqueur majeur de la nécroptose, ainsi que celle de CHOP, un marqueur de stress du RE et d'apoptose, était significativement augmentée (**Figure 2H du papier**). Malgré le phénotype sévère, il n'y avait pas d'altération de la fonction hépatique car la concentration sérique de bilirubine totale était comparable entre les souris OGT^{LKO} et OGT^{LWT}. De façon surprenante, l'immunomarquage OGT a montré des cellules positives à l'OGT dans les nodules de régénération (**Figure 2G du papier**), suggérant une contre-sélection contre les cellules déficientes en OGT lors de la régénération du foie (Baker et al., 2020).

1a) *Un régime pauvre en glucides et riche en graisses (LCHF) prévient le stress oxydant, le stress du RE et les dommages à l'ADN chez les souris OGT^{LKO} âgées de 8 semaines*

En raison de sa localisation anatomique, le foie est le premier organe qui absorbe le glucose ingéré après un repas. Pendant la période d'allaitement, les souris reçoivent une alimentation pauvre en glucides et riche en graisses, alors qu'au sevrage (vers l'âge de 3 semaines), elles reçoivent une alimentation contenant plus de 70 % de glucides. Un apport élevé en glucides est connu pour induire un stress oxydant (Du et al., 2010 ; Mohanty et al., 2000 ; de Carvalho Vidigal et al., 2012 ; Dickinson et al., 2008). Nous avons donc émis l'hypothèse qu'en absence de l'OGT, les hépatocytes pourraient être en incapacité à faire face au stress oxydant induit par le glucose alimentaire. En effet, il a été démontré que l'OGT exerce des effets protecteurs contre le stress oxydant en favorisant les réponses antioxydantes, alors que l'absence d'OGT est corrélée à un stress oxydant élevé en réponse à des concentrations élevées de glucose (Chen PH et al., 2018). Pour tester notre hypothèse, des souris OGT^{LWT} et OGT^{LKO} ont été sevrées avec un régime pauvre en glucides compensé par une augmentation des lipides (LCHF : 21 % de glucides, 60 % de lipides, 19 % de protéines) et maintenues à ce régime pendant un mois (**Figure S7A du papier**). Les souris témoins ont été sevrées avec un régime standard (SD : 69 % de glucides, 4 % de lipides, 26 % de protéines).

Dans le foie des souris OGT^{LKO} sevrées avec un régime HFLC, nous avons observé une réduction de l'expression des gènes impliqués dans la réponse au stress oxydant (**Figure 6A du papier**), une réduction des marqueurs de stress du RE (CHOP) et des marqueurs de dommages à l'ADN (γ H2AX) par rapport aux souris OGT^{LKO} sevrées avec un régime SD (**Figures 6C et 6D du papier**). Nous avons aussi observé une réduction de la concentration sérique de la cytokine circulante Cxcl1 (**Figure S7E du papier**) et des ALAT chez les souris OGT^{LKO} sevrées avec un régime HFLC (**Figure 6 du papier**).

Cependant, cette approche nutritionnelle n'a pas permis d'améliorer significativement le phénotype hépatique au niveau histologique (**Figure 6E du papier**). Comme certains lipides peuvent contribuer au stress oxydant et/ou au stress du RE (Natarajan et al., 2006), une analyse lipidomique a été réalisée dans le foie des souris nourries

soit avec le régime LCHF soit avec le régime SD. L'analyse lipidomique a révélé que la grande majorité des changements d'espèces lipidiques était due au changement alimentaire (LCHF vs SD) plutôt qu'à l'effet du génotype (OGT^{LKO} vs OGT^{LWT}) (**Figure S9 du papier**). L'ensemble de ces résultats suggère que même si le sevrage des souris OGT^{LKO} avec un régime LCHF améliore certains paramètres du phénotype (stress oxydant, stress du RE et dommages à l'ADN), il ne permet pas la prévention complète des altérations hépatiques, notamment la ballonnisation, l'inflammation, la réaction ductulaire et la fibrose.

1b) *Le régime cétogène prévient les altérations hépatiques des souris OGT^{LKO}*

Sachant que le régime LCHF contient tout de même 21 % de glucides, nous avons émis l'hypothèse qu'une diminution supplémentaire de la teneur en glucides du régime pourrait permettre d'améliorer le phénotype hépatique sévère des souris OGT^{LKO}. Pour ce faire, des souris OGT^{LWT} et OGT^{LKO} ont été sevrées avec un régime contenant uniquement 1% de glucides, le régime cétogène (KD : 1 % de glucides, 94% de lipides, 5% de protéines) (**Figure S8A du papier**). Nous avons tout d'abord confirmé que l'induction significative de marqueurs de stress oxydant (Gsta1, Gstm3) observée dans le foie des souris OGT^{LKO} sur un régime standard (OGT^{LKO} SD vs OGT^{LWT} SD) était significativement réduite lorsque les souris OGT^{LKO} étaient sevrées avec un régime KD (**Figure 7A du papier**).

L'amélioration du stress oxydant dans le foie des souris OGT^{LKO} sevrées avec un régime KD a été confirmé par la réduction significative de la polyploïdie hépatique sous régime KD par rapport au régime SD (**Figure 7B du papier**).

L'expression du marqueur de stress du RE (CHOP) (**Figures 7C et 7E du papier**) et du marqueur de dommages à l'ADN (γ H2AX) était également significativement réduite dans le foie des souris OGT^{LKO} KD par rapport aux souris OGT^{LKO} SD (**Figures 7D et 7E du papier**). Il est important de noter, que contrairement à ce que nous avons observé en réponse au régime LCHF, la ballonnisation hépatocytaire, l'inflammation, la réaction ductulaire et la fibrose des souris OGT^{LKO} ont été clairement prévenues dans les conditions de régime KD (**Figure 7F du papier**). Fait intéressant, nous avons également observé que des espèces lipidiques hépatiques spécifiques, précédemment associées à l'apoptose et à la fibrose hépatiques, (céramides C24 : 0, C24 : 1) (Shmarakov et al., 2019) n'étaient plus augmentés dans le foie lorsque les

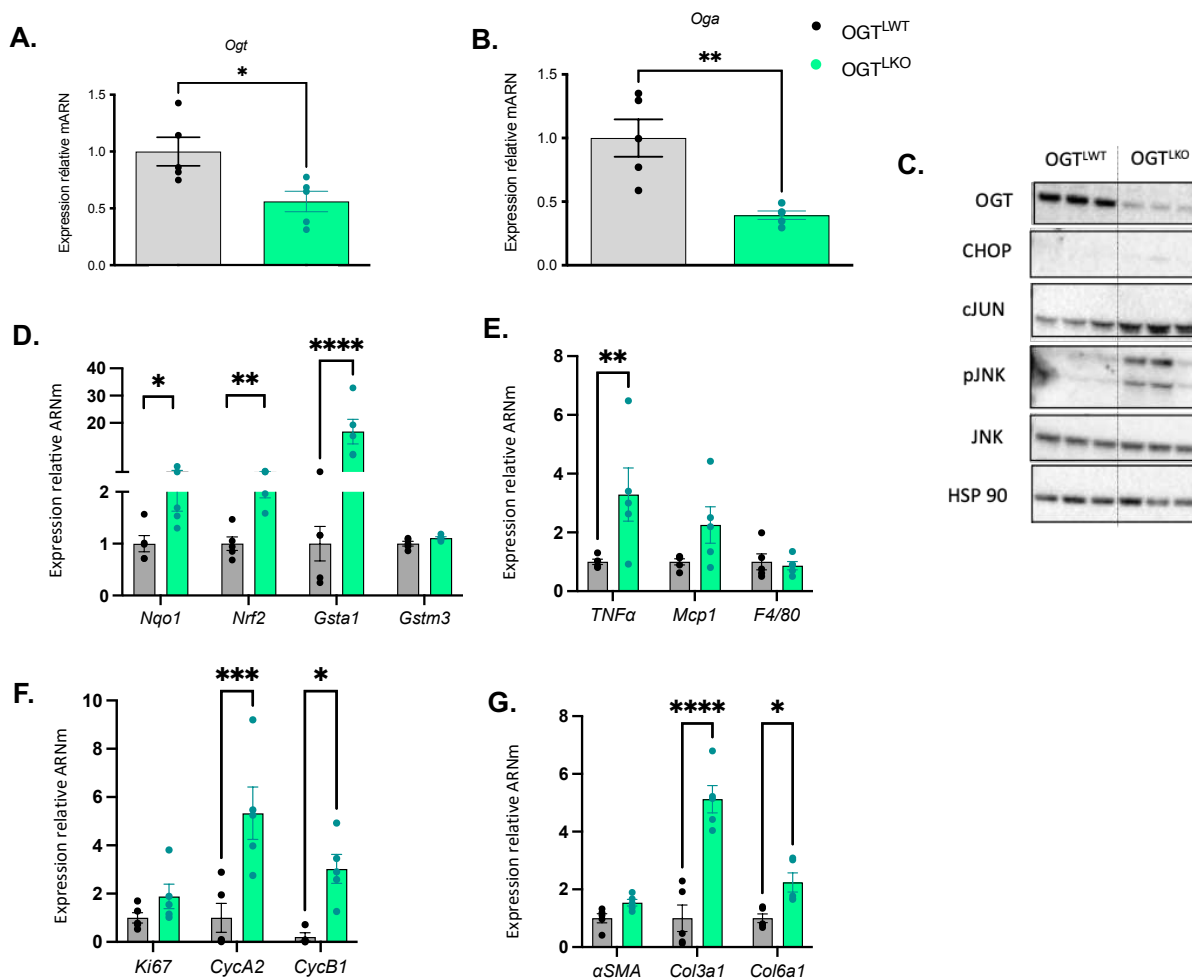


Figure 30. L'inactivation de l'OGT hépatocytaire entraîne une inflammation et un stress oxydant hépatique à 2 semaines

A. Expression relative de l'*Ogt* normalisée par rapport à l'expression de la GAPDH. **B.** Expression relative de l'*Oga* normalisée par rapport à l'expression de la GAPDH. **C.** Analyse par Western blot des niveaux d'OGT, CHOP, cJUN, pJNK, JNK totale dans des lysats de foie de souris *OGT*^{LWT} et *OGT*^{LKO} à 2 semaines. HSP90 (heat shock protein 90) a été utilisée comme contrôle de charge. Trois échantillons représentatifs sont présentés par condition. **D.** Niveaux relatifs d'expression des marqueurs de stress oxydant normalisés par rapport à l'expression de la GAPDH. **E.** Niveaux relatifs d'expression des marqueurs de l'inflammation normalisés par rapport à l'expression de la GAPDH. **F.** Niveaux relatifs d'expression des marqueurs de prolifération normalisés par rapport à l'expression de la GAPDH. **G.** Niveaux relatifs d'expression des marqueurs de fibrose normalisés par rapport à l'expression de la GAPDH. Les données sont présentées sous forme de moyenne \pm SEM de 5 à 10 souris mâles ou femelles. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ par test t de Student non apparié (Mann-Whitney).

souris OGT^{LKO} étaient sevrées avec un régime KD (**Figure S9 du papier**).

L'ensemble de ces résultats montre que le sevrage des souris OGT^{LKO} avec un régime KD a prévenu les altérations hépatiques des souris OGT^{LKO}.

2) Résultats complémentaires plus détaillés avec des figures originales

2a) Analyse du phénotype précoce des souris OGT^{LKO}

L'effet délétère de la délétion de l'OGT hépatocytaire est très précoce. En effet, nous avons observé que deux semaines après la naissance, les souris OGT^{LKO} ont, par rapport aux souris témoins, une augmentation significative de l'expression des marqueurs inflammatoires (cJUN, pJNK et *Tnfa*) (**Figures 30B et 30C**), associée à une augmentation de l'expression des marqueurs de stress oxydant (*Nqo1*, *Nrf2* et *Gsta1*) (**Figure 30D**), de prolifération (*CycA2* et *CycB1*) (**Figure 30E**) et des marqueurs de fibrose (*Col3a1*, *Col6a1*) (**Figure 30F**). Cependant, à l'analyse des coupes de foie, nous n'avons pas observé d'altération histologique significative chez les souris OGT^{LKO} (données non montrées).

2b) Effet de la délétion de l'OGT sur la voie FXR et sur les acides biliaires

Étant donné que le récepteur Farnesoid X (FXR) est un facteur de transcription contrôlé par la O-GlcNAcylation et que son activation a des effets anti-inflammatoires et antifibrotiques hépatiques chez les patients atteints de MASH (Arab et al., 2017), nous avons exploré si le phénotype hépatique des souris présentant une délétion de l'*Ogt* hépatocytaire était associé à la dérégulation de l'activité de FXR. De manière intéressante, les souris OGT^{LKO} ont une expression diminuée de *Fxr* et de certains de ses gènes cibles à 8 semaines de vie. Cette diminution est corrélée à une modification du profil des acides biliaires sériques (**Figures 32 G, 32H et 32I**).

A 8 semaines de vie, nous avons observé une réduction significative des acides biliaires glyco- et tauro- conjugués chez les souris OGT^{LKO} (**Figures 32E et 32F**). Nous avons, en particulier observé, chez les souris invalidées pour l'*Ogt* hépatocytaire, une augmentation significative des concentration sériques du β MCA, un puissant inhibiteur de FXR (Sayin et al., 2013) et une réduction des concentrations sériques de UDCA et de LCA, qui exercent des effets anti-inflammatoires et anti-fibrotiques dans le foie

(Shao et al., 2022, Buko et al., 2011). Nous avons analysé aussi la composition des acides biliaires caecaux et nous avons observé une augmentation de la concentration caecale de β MCA (données non montrées).

Nos résultats suggèrent que l'OGT joue un rôle important dans l'identité des cellules hépatiques et que sa déficience entraîne une détérioration rapide du statut hépatique ainsi qu'une réduction de la voie FXR et une modification du profil des acides biliaires chez les souris OGT^{LKO}.

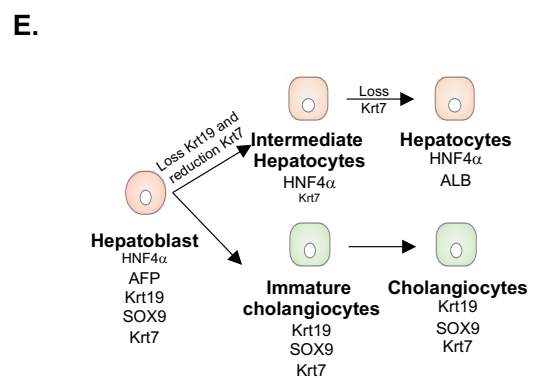
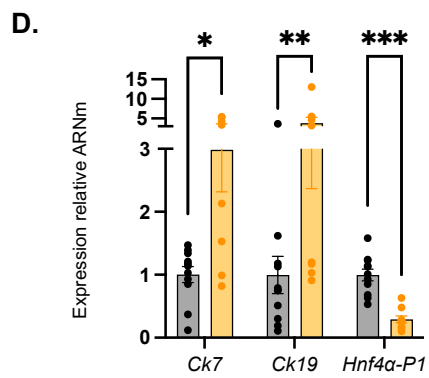
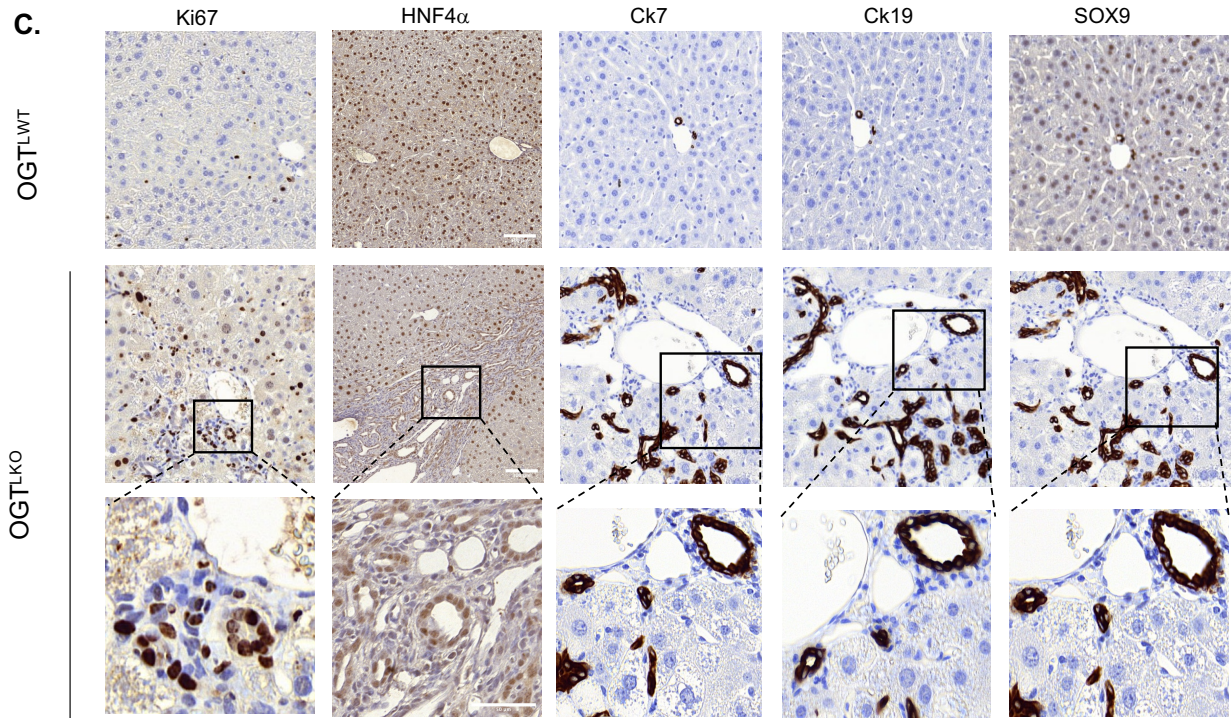
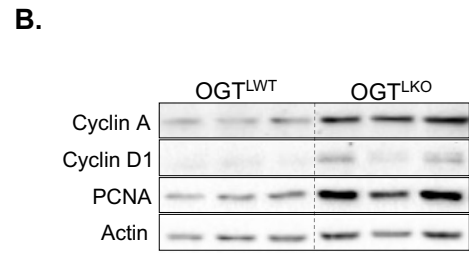
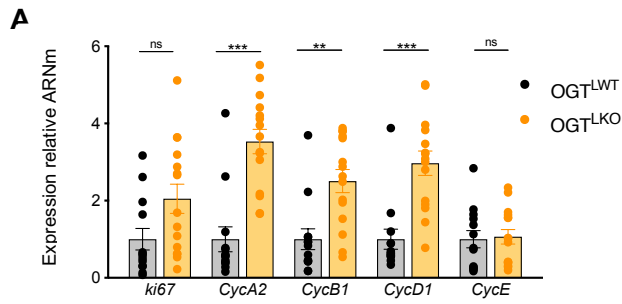


Figure 31. Les souris déficientes en OGT hépatocytaire présentent une réaction ductulaire diffuse à 8 semaines

A. Niveaux relatifs d'expression des marqueurs de prolifération normalisés au TBP. **B.** Analyse par Western blot des marqueurs de prolifération. Trois échantillons représentatifs sont présentés. L'actine a été utilisée pour normaliser. **C.** Coupes de foie de souris âgées de 8 semaines immunomarquées avec les anticorps Ki67, HNF4 α -P1, Ck7, Ck19 et SOX9. Barres d'échelle = 100 μ m sur les deux sections supérieures. Le zoom détaillé est affiché dans les sections inférieures avec une barre d'échelle = 50 μ m. **D.** Expression relative des marqueurs d'identité cellulaire normalisés par rapport à l'expression de la GAPDH dans le foie des souris OGT^{LWT} par rapport aux souris OGT^{LKO} à 8 semaines. **E.** Représentation de la différenciation des hépatoblastes en hépatocytes ou cholangiocytes. Les marqueurs utilisés pour la caractérisation cellulaire sont représentés sous chaque type cellulaire. Les données sont représentées par la moyenne \pm SEM de 13 à 15 souris à 8 semaines. **P < 0,01 ; ***P < 0,001 par test t de Student non apparié (Mann-Whitney).

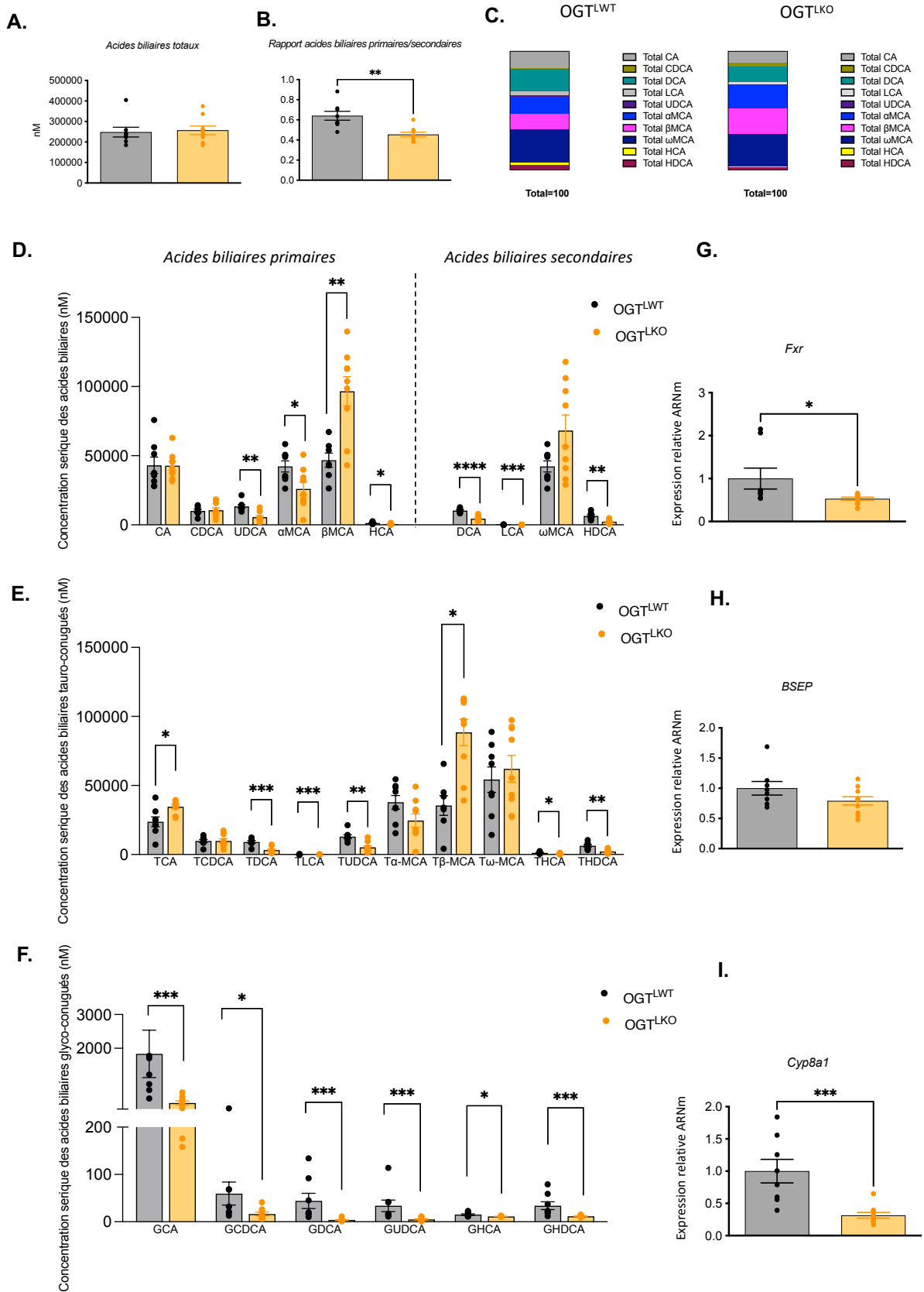


Figure 32 : Les souris OGT^{LKO} présentent une altération de la composition des acides biliaires sériques et de la voie FXR

A. Acide biliaires totaux sériques. **B.** Rapport acides biliaires primaires/acides biliaires secondaires. **C.** Composition acides biliaires sériques. **D.** Concentrations des acides biliaires primaires et secondaires. **E.** Concentrations des acides biliaires tauro-conjugués. **F.** Concentrations des acides biliaires glyco-conjugués. **G.H.I.** Expression relative de FXR, BSEP et *Cyp8a1* normalisée par rapport à l'expression de la GAPDH. Les données sont présentées sous forme de moyenne \pm SEM de 8 à 9 souris mâles. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ par test t de Student non apparié (Mann-Whitney).

2c) Analyse à long terme du phénotype des souris OGT^{LKO}

En poursuivant l'analyse de notre modèle, nous avons observé, chez les souris OGT^{LKO} âgées de 3 mois, des altérations hépatiques similaires à celles observées chez les souris âgées de 8 semaines, mais étonnamment, l'analyse des niveaux d'ARNm et de protéine de l'OGT a révélé une restauration de l'expression de l'OGT dans le foie des souris OGT^{LKO} ainsi qu'une augmentation des protéines O-GlcNAcylées (**Figures 33B et 33C**). Nous avons également observé que l'expression de l'OGA était augmentée (**Figures 33D**). Cette re-expression de l'OGT est associée à une réduction de l'expression de CHOP (**Figure 33D**). La réexpression de l'OGT hépatocytaire a été confirmée à 6 et 12 mois de vie (**Figure 34B**).

De plus, chez les souris OGT^{LKO} âgées de 12 mois, nous avons observé une diminution de l'expression des marqueurs de l'inflammation (*Tnf α* , *IL1 β* , *Mcp1* et *F4/80*) (données non montrées), diminution en accord avec la réduction importante de l'infiltration des macrophages hépatiques et avec une normalisation des marqueurs de cytolyse et de cholestase (ASAT, LDH et PAL) (**Figure 34E**). Par contre, les concentrations d'ALAT restaient plus élevées dans le serum des souris OGT^{LKO} par rapport aux souris OGT^{LWT} à 12 mois de vie (**Figure 34E**), suggérant des lésions hépatiques persistantes. De plus, l'expression des marqueurs du stress du RE (**Figure 34D**) et du stress oxydant (*Nrf2*, *Gsta1*, *Gstm3*) dans le foie des souris OGT^{LKO} n'était pas différente par rapport aux souris OGT^{LWT} à 12 mois de vie (données non montrées). Même si l'expression des marqueurs de fibrose (*Tgf β* , *α Sma*, *Col3a1* et *Col6a1*) était réduite dans le foie des souris OGT^{LKO} âgées de 12 mois par rapport à celles âgées de 4 et 8 semaines (données non montrées), la coloration Sirius Red a pu mettre en évidence une fibrose avancée persistante dans le foie des souris OGT^{LKO} âgées de 12 mois, fibrose associée à une activation résiduelle des fibroblastes hépatiques (**Figure 34F**).

2d) Développement d'adénomes chez les souris OGT^{LKO} femelles âgées de 12 mois

Afin de déterminer si le phénotype de fibrose pouvait évoluer vers le développement de lésions hépatiques, nous avons analysé un groupe de souris OGT^{LWT} et OGT^{LKO} mâles et femelles âgées de 12 à 18 mois. Nous avons pu observer que les souris femelles OGT^{LKO} âgées de 12 mois développent des lésions hépatiques compatibles

avec des adénomes hépatocytaires stéatosiques. En effet, ces lésions sont négatives à l'immunomarquage avec glutamine-synthétase (GS), PD1, β -caténine et Ck19. En outre il n'y a pas d'infiltrat inflammatoire significatif dans les lésions. Par contre les hépatocytes de ces adénomes expriment l'OGT (**Figure 35**).

En résumé nos données suggèrent que les souris avec un délétion constitutive de l'OGT hépatocytaire ont un phénotype sévère avec une inflammation et une fibrose hépatique avancée et spontanée dès 8 semaines de vie. Un processus de sélection négative des hépatocytes qui n'expriment pas l'OGT se met en place à partir de 3 mois de vie. Cependant, malgré la réexpression hépatique de l'OGT il n'y a pas une régression du phénotype hépatique qui reste sévère avec une fibrose persistante à 12 mois de vie.

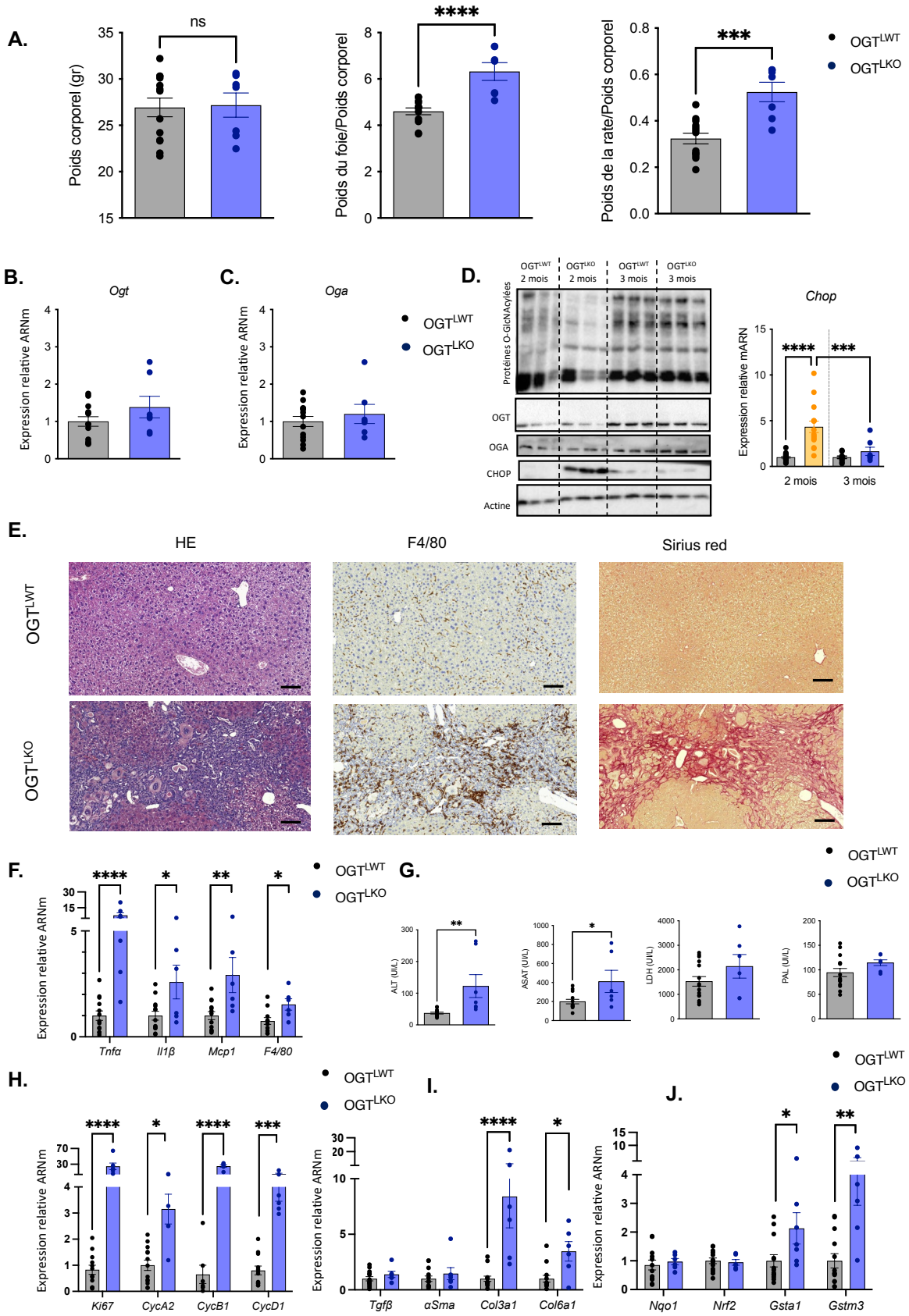


Figure 33. L'inactivation de l'OGT hépatocytaire entraîne une inflammation et une fibrose avancée à 3 mois de vie

A. Poids corporel (g), poids du foie et de la rate. **B.** Expression relative de l'Ogt normalisée à la GAPDH **C.** Expression relative de l'Oga normalisée à la GAPDH. **D.** Analyse par Western blot des niveaux de protéines O-GlcNAcylées, d'OGT, d'OGA, de CHOP dans des lysats de foie de souris OGT^{LWT} et OGT^{LKO} à 8 semaines et à 3 mois. L'actine a été utilisé comme contrôle de charge. Trois échantillons représentatifs sont présentés par condition. Expression relative de Chop (à 8 semaines et 3 mois) normalisée à la GAPDH. **E.** Coupes de foie colorées avec de l'hématoxyline-éosine (HE), F4/80 et Sirius Red. Barres d'échelle = 100 µm. **F.** Niveaux relatifs d'expression des marqueurs d'inflammation normalisés à la GAPDH **G.** Concentrations sériques d'alanine aminotransférase (ALAT), d'aspartate aminotransférase (ASAT), de lactate déshydrogénase (LDH) et de phosphatase alcaline (PAL). **H.** Niveaux relatifs d'expression des marqueurs de prolifération normalisés à la GAPDH. **I.** Niveaux relatifs d'expression des marqueurs de fibrose normalisés à la GAPDH. **J.** Niveaux relatifs d'expression des marqueurs de stress oxydant normalisés à la GAPDH. Les données sont présentées sous forme de moyenne ± SEM de 5 à 10 souris individuelles mâles ou femelle. *p < 0,05 ; **p < 0,01 ; ***p < 0,001; ****p < 0,0001 par test t de Student non apparié (Mann-Whitney).

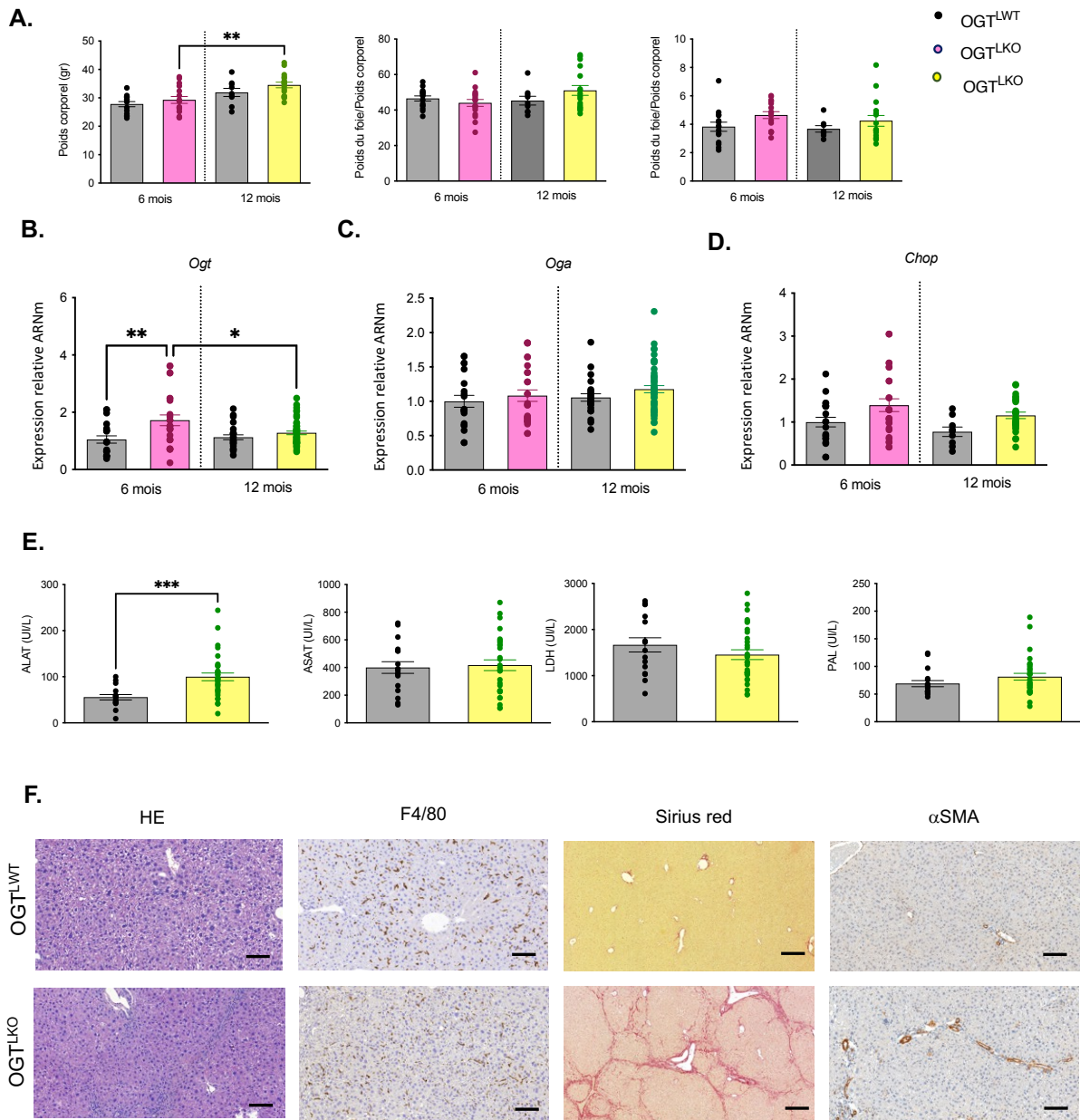
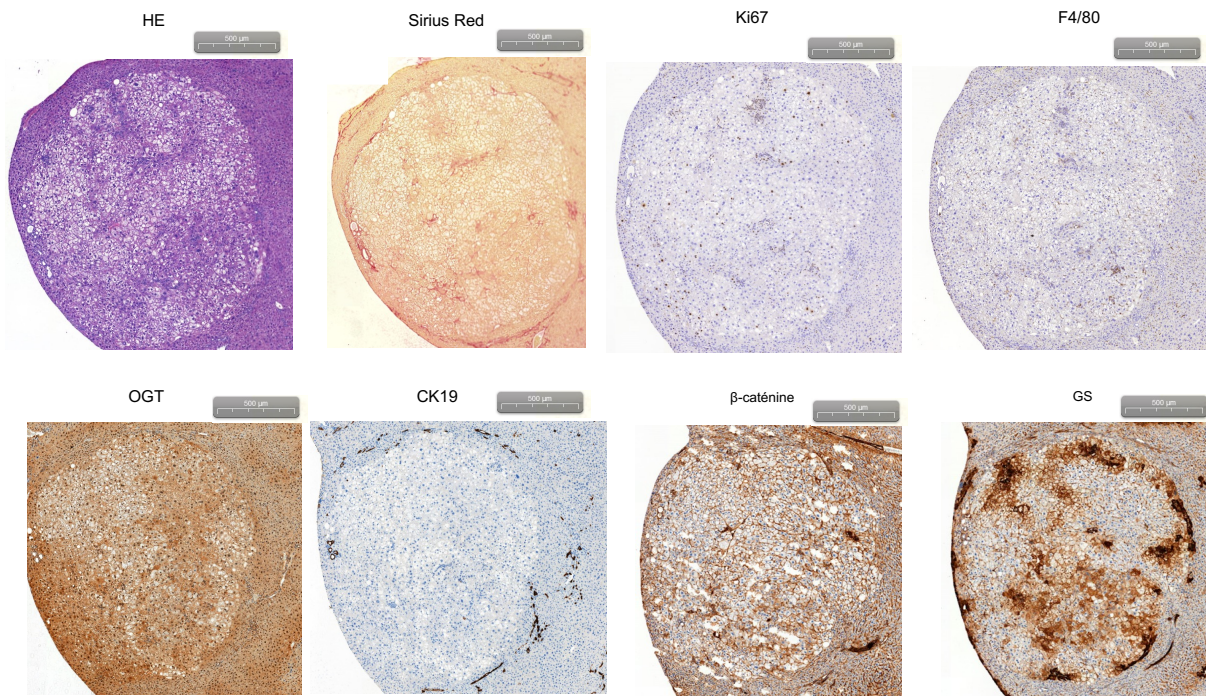


Figure 34. L'inactivation de l'OGT hépatocytaire entraîne une fibrose persistante à 1 an de vie

A. Poids corporel (g), poids du foie et de la rate. **B.** Expression relative de l'*Ogt* à 6 et 12 mois normalisée par l'expression de la GAPDH. **C.** Expression relative de l'*Oga* à 6 et 12 mois normalisée par l'expression de la GAPDH. **D.** Expression relative de *Chop* à 6 et 12 mois normalisée par l'expression de la GAPDH. **E.** Concentrations sériques d'alanine aminotransférase (ALAT), d'aspartate aminotransférase (ASAT), de lactate déshydrogénase (LDH) et de phosphatase alcaline (PAL) à 12 mois. **F.** Coupes de foie colorées par hématoxyline-éosine (HE), F4/80, Sirius Red et αSMA à 12 mois. Barres d'échelle = 100 μm et 200 μm pour Sirius Red. Les données sont présentées sous forme de moyenne ± SEM de 5 à 10 souris individuelles mâles ou femelles. *p < 0,05 ; **p < 0,01 ; ***p < 0,001 ; ****p < 0,0001 par test t de Student non apparié (Mann-Whitney)

A.



B.

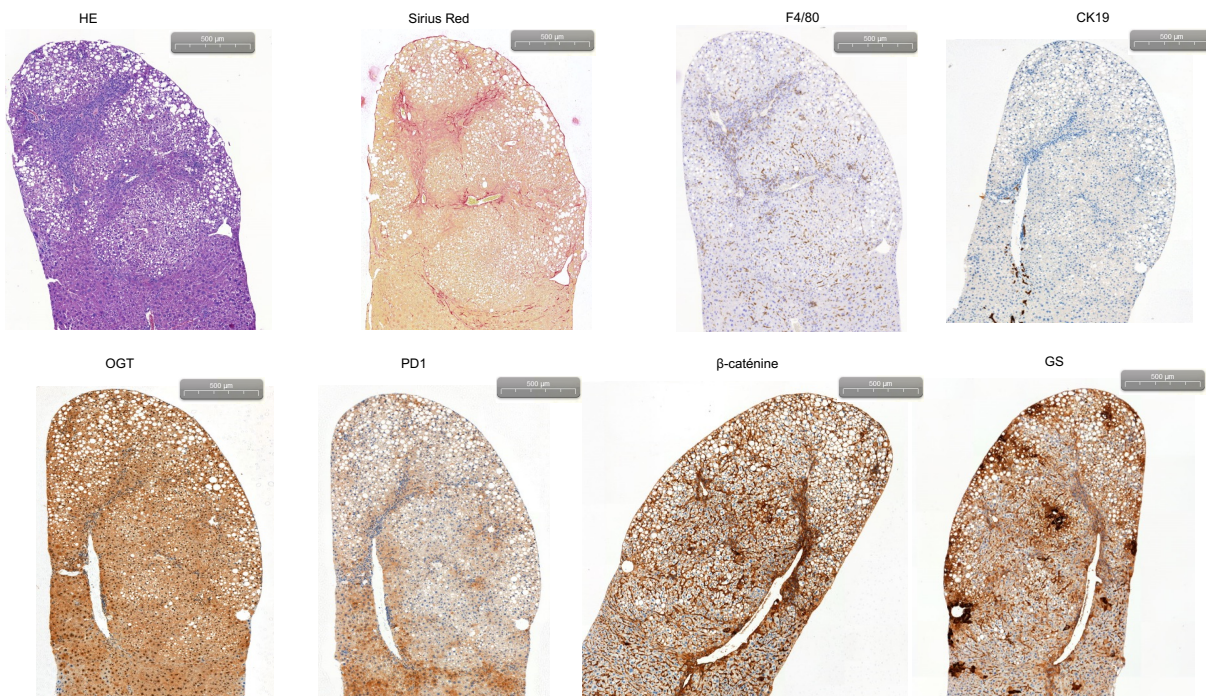


Figure 35. Le souris *OGT^{LKO}* femelles développent des adénomes stéatosiques à 1 an de vie

A. Coupes de foie colorées par hématoxyline-éosine (HE), Sirius Red, Ki67, F4/80, OGT, CK19, β -caténine, GS, glutamine synthétase). Barres d'échelle = 500 μ m.

B. Coupes de foie colorées par hématoxyline-éosine (HE), Sirius Red, F4/80, CK19, OGT, PD1, β -caténine et GS (glutamine synthétase). Barres d'échelle = 500 μ m.

Journal Pre-proof

O-GlcNAc transferase acts as a critical nutritional node for the control of liver homeostasis

Paula Ortega-Prieto, Lucia Parlati, Fadila Benhamed, Marion Regnier, Isadora Cavalcante, Mélanie Montabord, Rachel Onifarasoaniaina, Maryline Favier, Natasa Pavlovic, Julie Magusto, Michèle Cauzac, Patrick Pagesy, Jérémie Gautheron, Chantal Desdouets, Sandra Guilmeau, Tarik Issad, Catherine Postic

PII: S2589-5559(23)00209-4

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jhepr.2023.100878>

Reference: JHEPR 100878

To appear in: *JHEP Reports*

Received Date: 8 November 2022

Revised Date: 6 July 2023

Accepted Date: 24 July 2023

Please cite this article as: Ortega-Prieto P, Parlati L, Benhamed F, Regnier M, Cavalcante I, Montabord M, Onifarasoaniaina R, Favier M, Pavlovic N, Magusto J, Cauzac M, Pagesy P, Gautheron J, Desdouets C, Guilmeau S, Issad T, Postic C, O-GlcNAc transferase acts as a critical nutritional node for the control of liver homeostasis, *JHEP Reports* (2023), doi: <https://doi.org/10.1016/j.jhepr.2023.100878>.

This is a PDF file of an article that has undergone enhancements after acceptance, such as the addition of a cover page and metadata, and formatting for readability, but it is not yet the definitive version of record. This version will undergo additional copyediting, typesetting and review before it is published in its final form, but we are providing this version to give early visibility of the article. Please note that, during the production process, errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.

© 2023 Published by Elsevier B.V. on behalf of European Association for the Study of the Liver (EASL).



1
2 **O-GlcNAc transferase acts as a critical nutritional node for the control of liver**
3 **homeostasis**

4 Paula Ortega-Prieto^{1*}, Lucia Parlati^{1*}, Fadila Benhamed¹, Marion Regnier¹, Isadora
5 Cavalcante², Mélanie Montabord¹, Rachel Onifarasoaniaina³, Maryline Favier³, Natasa
6 Pavlovic⁴, Julie Magusto⁵, Michèle Cauzac¹, Patrick Pagesy¹, Jérémie Gautheron⁵, Chantal
7 Desdouets⁴, Sandra Guilmeau¹, Tarik Issad^{1#} and Catherine Postic^{1#}

8 ¹Université Paris Cité, Institut Cochin, CNRS, INSERM, Paris, France; ²Team Genomics and
9 signaling of endocrine tumors, Institut Cochin, CNRS, INSERM, Université Paris Cité, F-
10 75014 PARIS, France ; ³HistIM Platform, Institut Cochin, CNRS, INSERM, Université de
11 Paris Cité, F- 75014 PARIS, France; ⁴Team Proliferation, Stress and liver physiopathology,
12 Centre de Recherche des Cordeliers, INSERM, Sorbonne Université, Université Paris Cité, F-
13 75006 PARIS, France; ⁵Centre de Recherche Saint-Antoine, Sorbonne Université, Inserm,
14 Paris, France.

15
16
17 *These authors contributed equally

18 #Corresponding authors: catherine.postic@inserm.fr, tarik.issad@inserm.fr
19

20 **Financial statements**

21 P.O-P. was supported by the European Union's Horizon 2020 Research and Innovation
22 Programme under the Marie Skłodowska-Curie Grant Agreement No 675610 (Current address:
23 Drug Transport and Tumour Metabolism Lab, MRC London Institute of Medical Sciences,
24 London, UK) and L.P was supported by AFEF (Association Française pour l'Etude du Foie)
25 and by INSERM (Poste d'accueil). C.P. acknowledges the support of grants from the National
26 Agency for Research (ANR) (ANR-20-CE14-0038 IMAGINE; ANR-20-CE14-
27 HEPATOMORPHIC, ANR RHU QUID NASH).

28 **Data Availability Statement:** Data sharing subject to agreement.

29

30 **Abbreviations:** ALT, alanine aminotransferase; ALP, alkaline phosphatase; ARE, antioxidant
31 response element; AST, aspartate aminotransferase; β OHB, β hydroxybutyrate; Ccl5, C-C motif
32 chemokine ligand 5; CHOP, CCAAT-enhancer-binding protein homologous protein; Col3a1,
33 collagen type III alpha 1 chain; Col6a1, collagen type VI alpha 1 chain; CV, central vein; Cxcl1,
34 C-X-C motif chemokine ligand 1; Cyc, cyclin; DDB1, damage specific DNA binding protein
35 1; DE genes, differentially expressed genes; EZH, enhancer of zeste homolog; FDR, false
36 discovery rate; Foxo1, Forkhead box protein o1; G6Pase, Glucose-6-phosphate dehydrogenase;
37 GAPDH, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; GSH, reduced glutathione; GSSG,
38 oxidized glutathione; Gsta, glutathione S-transferase alpha; Gstm, glutathione S-transferase
39 mu; H2A.X, H2A.X variant histone; HBP, hexosamine biosynthesis pathway; HE, hematoxylin
40 eosin; HO1, heme oxygenase 1; HNF4 α , hepatocyte nuclear factor 4 α ; IL-1 β , interleukin-1 β ;
41 JNK, c-Jun N-terminal kinase; Krt7/19, Cytokeratin 7/19; LDH, lactate dehydrogenase; MDA,
42 malondialdehyde; MCP1, monocyte chemoattractant protein-1; MLKL, Mixed lineage kinase
43 domain like pseudokinase; NAFLD, non-alcoholic fatty liver disease; NASH, non-alcoholic
44 steatohepatitis; NqO1, NAD(P)H quinone dehydrogenase 1; NRF2, nuclear factor erythroid-
45 derived 2-related factor ; OGA, O-GlcNAcase; OGT, O-GlcNAc transferase; PCNA,
46 proliferating cell nuclear antigen; PEPCK, Phosphoenolpyruvate carboxykinase; PV, portal
47 vein; RT-qPCR, quantitative reverse transcription PCR; RIPK3, Receptor-interacting
48 serine/threonine-protein kinase 3, ROS, reactive oxygen species; α SMA, alpha-smooth muscle
49 actin; SOX9, sex determining region Y-box 2; TBP, TATA-box binding protein; TGF β ,
50 transforming growth factor β ; TNF α , tumor necrosis factor alpha; TUNEL, Terminal
51 deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labelling, WGA, wheat germ agglutinin; YAP,
52 yes-associated protein.

53

54 **Abstract**

55 *Background & Aims:* O-GlcNAcylation is a reversible post-translational modification
56 controlled by the activity of two enzymes, O-GlcNAc transferase (OGT) and O-GlcNAcase
57 (OGA). In liver, O-GlcNAcylation has emerged as an important regulatory mechanism
58 underlying normal liver physiology and metabolic disease.

59 *Methods:* To address whether OGT acts as a critical hepatic nutritional node, mice with a
60 constitutive hepatocyte-specific deletion of OGT (OGT^{LKO}) were generated and challenged
61 with different carbohydrate- and lipid-containing diets.

62 *Results:* Analyses of 4 week-old OGT^{LKO} mice revealed significant oxidative and ER stress,
63 DNA damage, together with inflammation and fibrosis in liver. Susceptibility to oxidative and
64 ER stress-induced apoptosis was also elevated in OGT^{LKO} hepatocytes. While OGT expression
65 was partially recovered in liver of 8 week-old OGT^{LKO} mice, hepatic injury and fibrosis were
66 not rescued but rather worsened with time. Interestingly, weaning of OGT^{LKO} mice on a
67 ketogenic diet (low carbohydrate high fat), fully prevented the hepatic alterations induced by
68 OGT deletion, indicating that reduced carbohydrate intake protects OGT deficient liver.

69 *Conclusion:* These findings pinpoint OGT as a key mediator of hepatocyte homeostasis and
70 survival upon carbohydrate intake and validate OGT^{LKO} mice as a valuable model for assessing
71 therapeutical approaches of advanced liver fibrosis.

72
73 **Key words:** OGT, oxidative stress, liver fibrosis, carbohydrate intake, ketogenic diet

74 **Electronic word counts:** 7497

75 **Number of figures:** 7

76 **Number of tables:** 0

77

78

79 Impact and implications

80

81 Our study shows that hepatocyte-specific deletion of O-GlcNAc transferase (OGT) leads to
82 severe liver injury, reinforcing the importance of O-GlcNAcylation and OGT for hepatocyte
83 homeostasis and survival. Our study also validates the *Ogt* liver deficient mouse as a valuable
84 model for the study of advanced liver fibrosis. Importantly, since the severe hepatic fibrosis of
85 *Ogt* liver deficient mice could be fully prevented upon feeding on a ketogenic diet (i.e. very
86 low carbohydrate high fat diet) underlines the potential interest of nutritional intervention as
87 anti-fibrogenic strategies.

88

89

Journal Pre-proof

90 **Introduction**

91 O-GlcNAcylation is a dynamic and reversible post-translational modification controlled by the
92 activity of two enzymes, O-GlcNAc transferase (OGT) and O-GlcNAcase (OGA). OGT and
93 OGA mediate the dynamic cycling of O-GlcNAcylation on a wide variety of cytosolic, nuclear
94 and mitochondrial proteins, in response to environmental changes, such as nutrients or stress
95 challenges (Yang and Qian, 2017). Therefore, O-GlcNAcylation has been proposed as a
96 nutrient and stress sensor, that mediates cellular adaptations ranging from transcription and
97 translation to signal transduction and metabolism. As a result, disruption of O-GlcNAc
98 homeostasis has been implicated in the pathogenesis of several human diseases, including
99 cancer, diabetes and neurodegeneration (Nie and Yi, 2019).

100 In the liver, O-GlcNAcylation has emerged as an important regulatory mechanism underlying
101 normal liver physiology and metabolic disease. O-GlcNAcylation significantly contributes to
102 liver gluco-lipotoxicity by modulating key effectors of hepatic metabolism (Guinez et al., 2011;
103 Kuo et al., 2008). Moreover, OGT acts as a suppressor of hepatocyte necroptosis (a specific
104 form of regulated cell death) and its hepatic deletion triggers liver fibrosis in mice (Zhang et
105 al., 2019). Altogether, these studies suggested that OGT may act as a critical molecular switch
106 between hepatocyte survival and death in response to chronic liver injury (Zhang et al., 2019).

107 While several cellular functions of O-GlcNAcylation are clearly emerging, we
108 hypothesize that OGT loss of function may prevent liver cells to cope with the oxidative stress
109 induced by dietary glucose (Du et al., 2010; Mohanty et al., 2000; de Carvalho Vidigal et al.,
110 2012; Dickinson et al., 2008). Indeed, OGT was shown to protect against oxidative stress by
111 promoting antioxidant responses, whereas lack of OGT correlates with high oxidative stress in
112 response to elevated glucose concentrations (Chen et al., 2018). To test this hypothesis, we first
113 examined at different time points ranging from 2 weeks to 1 year, the phenotype of mice with
114 a constitutive OGT deficiency in hepatocytes (OGT^{LKO}) and fed a 70% carbohydrates diet. We

115 then explored whether limiting carbohydrate intake at weaning could protect the liver against
116 lack of OGT. Interestingly, analysis of OGT^{LKO} mice at 4 weeks revealed the onset of hepatic
117 oxidative and ER stress, DNA damage, together with liver inflammation and moderate fibrosis.
118 Liver injury and fibrosis worsened with time when OGT^{LKO} mice were maintained on a high
119 carbohydrate diet, as characterized by advanced hepatic fibrosis and septa surrounding
120 regenerative nodules. Interestingly, weaning OGT^{LKO} mice on a ketogenic low carbohydrate
121 (1%) high fat diet, to limit carbohydrate intake, fully prevented the severe hepatic alterations
122 induced by early OGT deletion, including advanced fibrosis. These findings underline the
123 critical role of OGT in hepatocytes homeostasis and survival upon carbohydrate intake. Our
124 study also establishes the OGT^{LKO} mouse model as a spontaneous model of advanced fibrosis,
125 that may, in the future, facilitate therapeutic target identification for prevention and treatment
126 of chronic liver disease.

127

128

129

130

131 **Material and methods**

132 **Generation of OGT^{LKO} mice**

133 Conditional hepatic-specific OGT knock out mice (OGT^{LKO}) and control floxed littermates
134 (OGT^{LWT}) were generated by crossing *Albumin-Cre; Ogt^{F/Y}* with *Ogt^{F/F}* mice. *The Ogt* locus
135 was floxed on either side of the exons 6-7 encoding amino acids 206 and 232. *Ogt* mice were
136 obtained from Jackson Laboratories (JAX stock #00486).

137

138 **Animals and nutritional challenges**

139 All animal procedures were carried out according to the French guidelines for the care and use
140 of experimental animals (Animal authorization agreements #9723, #19226 and #33226 from
141 University of Paris Ethical Committee). Mice (males and females) were housed in colony
142 housing on a 12hr light/dark cycle. All mice were given free access to water and control chow
143 diet (Standard diet (SD) in % of calories: 69% of carbohydrates, 4% of fat and 26% of proteins;
144 SAFE #A03). Regarding nutritional challenges, OGT^{LWT} and OGT^{LKO} mice were weaning and
145 fed for 5 weeks with a low carbohydrate high fat diet (LCHF in % of calories: 21% of
146 carbohydrates, 60% of fat, 19% of proteins) (SSNIF #E15742) or a ketogenic diet (KD in % of
147 calories: 1% of carbohydrates, 94% of fat, 5% of proteins) (SSNIF #E15149). The age and sex
148 of the mice are specified in the results and figure legends.

149

150 **Blood glucose concentrations and glucose homeostasis**

151 Blood glucose was measured in total blood using an Accu-Check glucometer (Roche). Glucose
152 tolerance tests (GTT), pyruvate tolerance tests (PTT) and insulin tolerance tests (ITT) were
153 performed in 4 week-old OGT^{LKO} and control OGT^{LWT} littermates. For GTT, mice were fasted
154 4 to 5 hours and received 2g/kg of glucose; for PTT, mice were fasted overnight and received

155 1g/kg of pyruvate; for ITT, mice were fasted 4 to 5 hours and received 0.75U/kg of insulin.
156 Blood glucose concentrations were measured over a period of 120 minutes for all tests.

157 **β -hydroxybutyrate concentrations**

158 β -Hydroxybutyrate was measured with Optium β -ketone test strips that carried Optium Xceed
159 sensors (Abbott Diabetes Care).

160 **Cytokines and liver enzymes concentrations**

161 Concentrations of serum cytokines were analyzed using the V-PLEX proinflammatory panel 1
162 mouse kit (Mesoscale, K15048D). Serum alanine aminotransferase (ALT), aspartate
163 aminotransferase (AST), lactate dehydrogenase (LDH), alkaline phosphatase (ALP) and total
164 and direct bilirubin concentrations were determined using an automated Monarch device
165 (Laboratoire de Biochimie, Faculté de Médecine Bichat, France).

166 **RNA isolation, reverse transcription and qPCR**

167 Snap frozen liver tissue was powdered and approximately 15mg of liver powder was used for
168 RNA extraction using the SV Total RNA isolation system (Promega, Z3101). mRNAs were
169 reverse transcribed and cDNA levels were measured by qPCR (LightCycler480 SYBR Green I
170 Master, Roche) using the primers described in the Table S4. Gene expression was normalized
171 over expression of the TATA-box binding protein (TBP) mRNA levels.

172 **Protein extraction, western blot and wheat germ agglutinin (WGA) precipitation** 173 **experiments**

174 Whole tissue was lysed in lysis buffer (20mM Tris HCl [pH 7.5], 150mM NaCl, 5mM EDTA,
175 50mM NaF, 30mM NaP, 1% Triton X-100, EDTA free protease inhibitor cocktail [Roche,
176 4693132001], orthovanadate 1mM, Thiamet-G 10 μ M [Sigma, SML0244]). Western blot was
177 performed using 30 μ g of lysate. For lectin-based precipitation assay, the lysate (1mg of

178 proteins) was incubated overnight with 25 μ L of WGA agarose beads (Sigma, L1882) at 4°C.
179 The precipitate was resolved by SDS-PAGE and immunoblotted with specific antibodies.
180 Antibodies used are the following: anti-OGT (Sigma, SAB4200311), anti-O-linked N-
181 acetylglucosamine antibody (RL2, ab2739), anti-GAPDH (Santa Cruz, sc-25778), anti- β -actin
182 (CST #4970), anti-CycA2 (Santa Cruz, sc-596), anti-CycD1 (CST #2978), anti-PCNA (CST
183 #2586), anti-p62 (Enzo Life Sciences, BML-PW9860-0100), anti-p-p62 (CST #14354), anti-
184 CHOP (CST #5554), anti- γ H2AX (CST #2577), anti-H2AX total (CST #7631), anti-Cleaved
185 Caspase-3 (CST #9661), anti-MLKL (ab172868), anti-RIPK3 (orb74415), anti-Foxo1 (CST
186 #2880), Anti-JNK (CST #9252), anti p-JNK (CST#9255). Semi-quantitative analysis was
187 performed using ChemiDoc software (Bio-rad).

188 **Histological analyses and tissue staining**

189 Fixed livers (4% PFA, 24h at 4°C) were embedded in paraffin and sliced at 7 μ m. After
190 deparaffinization and rehydration, slides were stained with hematoxylin-eosin (HE), Sirius red
191 and α SMA for fibrosis detection. In the case of immunolabeling, antigen retrieval was
192 performed in citrate buffer for 10 min at 95°C and treated with peroxidase blocking reagent
193 (Sigma, H1009). Slides were permeabilized with 0.01% Tween20 and unspecific antigenicity
194 was blocked with 2% BSA and 2% serum, from the species in which the secondary antibody
195 was raised. Primary antibodies used are the following: anti-OGT (Abcam, ab96718), anti-Ki67
196 (ThermoFisher, MA5-14520), anti-HNF4 α (Santa Cruz, sc-6556), anti-SOX9 (EMD millipore,
197 ab5535) and anti-Krt19 (Abcam, ab52625), anti-F4/80 (CST#70076), anti-MDA (Abcam,
198 ab27642). Secondary antibodies HRP-conjugated were revealed by incubation with DAB
199 substrate (Dako, K3468), co-stained with hematoxylin (Vector laboratories, H-3404) and
200 mounted with VectaMount™ mounting medium (Vector laboratories, H-5000). For apoptosis,
201 the TUNEL kit (EMD Millipore kit S71000) was used. Images analysis was processed with
202 QuPath software.

203 **Polyploidy assessment**

204 To analyse polyploidy, liver sections were stained with Hoechst 33342, after which a dataset
205 with nuclei size and circularity was extracted using QuPath. Then, by using R software, a
206 dataset containing only hepatocyte nuclei was generated based on size ($>30\ \mu\text{m}$) and circularity
207 (>0.8). Nuclear ploidy was assessed automatically, by a specific macro developed with Image
208 J software, as previously described (Gentric et al., 2015). Hepatocyte polyploidy is presented
209 as the ratio between the number of polyplloid cells and total hepatocytes.

210 **Liver neutral lipid analysis**

211 Hepatic lipids were extracted from liver samples as previously described elsewhere (Bligh EG,
212 Dyer WJ, 1959). Briefly, 50 mg of liver were homogenized in 2:1 (v/v) methanol/EGTA (5mM)
213 and lipids from 2mg of liver were extracted in a mix of methanol, chloroform and water
214 (2.5:2.5:2, v/v/v) in the presence of internal standards (glyceryltrinonadecanoate, stigmasterol
215 and cholesteryl heptadecanoate). Triglycerides, free cholesterol, and cholesterol esters were
216 analyzed by gas chromatography on a Focus Thermo Electron system using a Zebron-1
217 Phenomenex fused-silica capillary column (5 m, 0.32 mm i.d., 0.50 μm film thickness). The
218 oven temperature was programmed from 200 to 350°C at a rate of 5°C/min, and the carrier gas
219 was hydrogen (0.5 bar). The injector and detector were at 315°C and 345°C, respectively.

220 **Liver fatty acid analysis**

221 Fatty acid methyl esters (FAME) molecular species were extracted from an equivalent of 1mg
222 liver tissue in the presence of internal standards glyceryl triheptadecanoate (2 μg). The lipid
223 extract was transmethylated with 1 ml BF₃ in methanol (14% solution; Sigma) and 1 ml heptane
224 for 60 min at 80°C and evaporated to dryness. The FAMEs were extracted with heptane/water
225 (2:1). The organic phase was evaporated to dryness and dissolved in 50 μl ethyl acetate. A
226 sample (1 μl) of total FAMEs was analyzed with gas-liquid chromatography (Clarus 600 Perkin

227 Elmer system, with Famewax RESTEK fused silica capillary columns, 30-m×0.32-mm i.d.,
228 0.25- μ m film thickness). Oven temperature was programmed to increase from 110°C to 220°C
229 at a rate of 2°C/min, and the carrier gas was hydrogen (7.25 psi). Injector and detector
230 temperatures were 225°C and 245°C, respectively.

231 **Liver sphingomyelin and ceramide analysis**

232 Lipids were extracted from the liver (1 mg) as described by Bligh and Dyer in
233 dichloromethane/methanol (2% acetic acid)/water (2.5:2.5:2 v/v/v). Internal standards were
234 added (Cer d18:1/15:0, 16 ng; SM d18:1/12:0, 16 ng). The solution was centrifuged at 1500
235 rpm for 3 min. The organic phase was collected and dried under azote, then dissolved in 50 μ l
236 MeOH. Sample solutions were analyzed with an Agilent 1290 UPLC system coupled to a
237 G6460 triple quadrupole spectrometer (Agilent Technologies). MassHunter software was used
238 for data acquisition and analysis. A Kinetex HILIC column was used for LC separations. The
239 column temperature was maintained at 40°C. The mobile phase A was Acetonitrile; and B was
240 10 mM ammonium formate in water at pH 3.2. The gradient was as follows: from 10% to 30%
241 B in 10 min; 100% B from 10 to 12 min; and then back to 10% B at 13 min for 1 min to re-
242 equilibrate prior to the next injection. The flow rate of the mobile phase was 0.3 ml/min, and
243 the injection volume was 5 μ l. An electrospray source was employed in positive ion mode. The
244 collision gas was nitrogen. Needle voltage was set at +4000 V. Several scan modes were used.
245 First, to obtain the naturally different masses of different species, we analyzed cell lipid extracts
246 with a precursor ion scan at 184 m/z and 264 m/z for SM and Cer, respectively. The collision
247 energy optimums for Cer, SM were 25 eV, 45 eV respectively. Then, the corresponding SRM
248 transitions were used to quantify different phospholipid species for each class. Two 9 MRM
249 acquisitions were necessary, due to important differences between phospholipid classes. Data
250 were treated with QqQ Quantitative (vB.05.00) and Qualitative analysis software (vB.04.00).

251 Microarray based transcriptome profiling

252 Liver RNA extraction was performed as mentioned previously and checked for integrity using
253 Bioanalyzer. Microarray experiment and data normalization were performed by the
254 transcriptomic core facility at Cochin Institute. Briefly, gene expression profiling was carried
255 out on 5 biological replicates per condition. After RNA quality validation with Bioanalyzer
256 2100, RNA was reversed transcribed following the manufacturer protocol (GeneChip® WT
257 Plus Reagent Kit, Thermofisher). After fragmentation and biotin labelling, cDNA was
258 hybridized to GeneChip® Clariom S Mouse (Thermofischer) and scanned using the GCS3000
259 7G. The images were analyzed with Expression Console software (Thermofischer). Raw data
260 were normalized using the Robust Multichip Algorithm (RMA). Statistics and RMA
261 normalization were performed using TAC4.0 software (Thermofisher).

262 Downstream analysis was done to identify differentially expressed (DE) genes based in
263 comparison with control conditions. The DE genes were selected based on the corrected p-value
264 for False Discovery Rate (FDR p-value < 0.05) and the fold change from OGT^{LKO} compared to
265 controls (up-regulated genes: fold change ≥ 2 , down-regulated genes: fold change ≤ -2). Venn
266 diagram was performed using the interactive tool 'Venny 2.1.0' (Oliveros et al. 2007-2015).
267 Up-regulated and down-regulated genes were annotated using Reactome gene set. Functional
268 enrichment of specific pathways in the gene set was performed using Fisher's exact test and
269 FDR correction. Pathways were considered significantly enriched at an FDR < 0.05. R
270 statistical software v.3.6.2 and R packages were used for bioinformatic analysis and graph
271 representation. Volcano plots were represented using the "Enhanced Volcano" package (Blighe
272 et al. 2019). Heatmaps were represented using 'pheatmap' package (R. Kolde, 2019), where
273 correlation clustering distance row was applied.

274 Primary hepatocyte isolation and culture

275 Four weeks old mice were anesthetized with a 10:1 ketamine-xylazine solution intra-peritoneal.
276 Liver was perfused through the portal vein with Hank's balanced salt solution followed by
277 collagenase perfusion. Cell viability was calculated by trypan blue exclusion test using a
278 Malassez chamber and seeded in 6-well plates at a concentration of 500 000 cells per well.
279 Cells were seeded in medium M199 5mM of glucose (Thermofisher, #11150059) supplemented
280 with 100 µg/mL streptomycin, 100 units/mL of penicillin, L-glutamine (2 mM), 0.1% Bovine
281 serum albumin, 2.5% Nu-serum (BD Bioscience, Cat#355104) and dexamethasone (100nM,
282 Novo Nordisk). For reduced glutathione/oxidized glutathione (GSH/GSSG) assay, hepatocytes
283 were seeded in 96-well plates at a concentration of 15 000 cells per well. Twenty-four hours
284 after seeding, the GSH/GSSG ratio was measured using GSH/GSSG-Glo assay kit (Promega,
285 Madison, WI) in accordance with the manufacturer's instructions. Experiments with
286 Staurosporine were performed by seeding hepatocytes in 6 cm² dishes at a concentration of
287 1.5×10^6 cells per dish. Twenty-four hours after seeding, cells were treated with 10µM of
288 Staurosporine (Sigma, S4400) and harvested 0, 2, 4 and 8 hours after treatment for protein
289 extraction. For Thapsigargin experiments, 24 hours after seeding, cells were treated with 0.3µM
290 of Thapsigargin (Sigma, T9033) for 24 hours. Total level of lipid peroxidation was analyzed
291 by flow cytometry-based Bodipy 581/591 assays (Molecular Probes), as recommended by the
292 manufacturer. Forty-eight hours after seeding, cells were treated with 5 µM of BODIPY for 30
293 minutes at 37°C. Cells were then collected and washed with PBS. For each experiment, 20.000
294 events were acquired by flow cytometry using Novocyte Cytometer (Ozyme). Data were
295 analysed using the Novoexpress Software. Total ROS levels were measured by using Cellrox
296 Deep red Reagent (Thermofisher) at a final concentration of 2.5 µM and then incubated for 30
297 minutes at 37°C. Data were analysed using the Novoexpress Software. For ARE-luciferase
298 activity, cells were transfected with a 3xARE-Luciferase reporter (Wang et al., 2006) and a β-

299 galactosidase plasmid using Lipofectamine 2000 and OptiMEM media. After overnight
300 incubation, medium was changed to low glucose (5mM) for 24 hours. Luciferase assay was
301 performed after cell lysis. β -galactosidase assays were performed for normalization of 3xARE-
302 luciferase activity.

303 **Second Harmonic Generation microscopy (SHG) for fibrosis quantification**

304 SHG images were acquired with a multiphoton Leica DIVE microscope (Leica microsystems
305 Gmbh, Wetzlar, Germany) coupled with a Coherent Discovery (Coherent Inc., Santa Clara,
306 CA, USA) laser source. Five fields of view were acquired from paraffin embedded 7 μ m-thick
307 sections of liver. Two-photon-excited autofluorescence and SHG images were acquired through
308 a Leica Microsystems HCX IRAPO 25x/0.95 water immersion objective by tuning the laser at
309 1040nm at constant power and photomultiplier tubes and hybrid detectors were used at constant
310 800V and 80% gain respectively allowing direct comparison of SHG intensity values.
311 Circularly polarized laser pulse was sent to the microscope objective to excite isotropically the
312 slice regardless of the orientation of fibrillar collagen. To quantify SHG, the microscope was
313 calibrated using a non-fibrotic control liver section. SHG score was proceeded using a
314 homemade ImageJ (<http://imagej.nih.gov/ij/>) routine, as described previously (Guilbert et al.,
315 2010).

316 317 **Statistical analysis**

318 All statistical analysis were performed using Prism GraphPad Software Inc. The number of
319 independent experiments performed and the statistical test used are indicated in each figure
320 legend.

321

322

323

324 **Results**

325

326 **Hepatocyte-specific OGT deletion triggers liver inflammation and moderate fibrosis at 4**
327 **weeks.**

328 Four weeks after birth, fed blood glucose, body weight, liver and spleen weights were not found
329 different in OGT^{LKO} compared to OGT^{LWT} mice (**Figure 1A**). OGT mRNA and protein levels
330 (assessed by Western blot and immunostaining) were significantly reduced only in the liver of
331 OGT^{LKO} mice, together with a parallel decrease in O-GlcNAcylated proteins (**Figures 1B, 1D**
332 **and 1E**) confirming recombination efficiency and tissue specificity. We also observed a
333 significant decrease in OGA expression in the liver (**Figure 1C**). The activities of OGT and
334 OGA are governed by multilayered feedback mechanisms that finely tune the overall levels of
335 O-GlcNAcylation in the cell. Studies have established that alterations in OGA activity affect
336 OGT activity and vice versa (Park et al., 2017). While the mechanism(s) used to modulate OGA
337 protein levels in response to O-GlcNAc remain unknown, studies have suggested that OGA
338 transcription is sensitive to changes in O-GlcNAc homeostasis and is potentially regulated by
339 O-GlcNAc (Park et al., 2017). Physiological tests further analyses revealed decreased blood
340 concentrations upon short-term fasting (5 hours) (**Figure S1A**), improved glucose (**Figure**
341 **S1B**) and pyruvate tolerance (**Figure S1C**) in OGT^{LKO} compared to OGT^{LWT} mice, without,
342 however, any modification in insulin sensitivity (**Figure S1D**). Decreased fasting blood glucose
343 and increased pyruvate tolerance suggested decreased gluconeogenic capacity in OGT^{LKO}
344 compared to OGT^{LWT} mice. To better understand the improvement in glucose homeostasis
345 observed in OGT^{LKO} mice, we measured protein and the O-GlcNAcylation levels (Kuo et al.,
346 2008) of the transcription factor Forkhead box protein o1 (Foxo1) (**Figure S1E**), that is known
347 to stimulate the expression of gluconeogenic genes, including Glucose-6-phosphatase (*G6Pase*)
348 and Phosphoenolpyruvate carboxykinase (*Pepck*) (**Figure S1F**). Of note, Foxo1 O-

349 GlcNAcylation levels were markedly decreased in liver of OGT^{LKO} compared to OGT^{LWT} mice
350 (**Figure S1E**), as well as mRNA levels of its target genes (*G6Pase*, *Pepck*) (**Figure S1F**).
351 Histological assessment by hematoxylin-eosin (HE), Sirius red or α SMA staining evidenced
352 hepatic parenchymal alteration in OGT^{LKO} mice compared to OGT^{LWT}. In fact, OGT^{LKO} liver
353 showed hepatocellular ballooning, and moderate fibrosis together with fibroblast activation
354 (**Figure 1E**). In agreement, the expression of fibrosis markers (*Tgf β* , *α Sma*, *Col3a1* and
355 *Col6a1*) was found significantly increased in livers of OGT^{LKO} mice compared to OGT^{LWT}
356 (**Figure 1F**). In addition, positive staining for TUNEL, Krt7 (Cytokeratin7) and SOX9 in livers
357 of 4 week-old OGT^{LKO} mice suggested emerging liver injury and apoptosis, ductular reaction
358 and hepatic progenitor cell activation (**Figure 1E**). This observation was correlated with a
359 significant increase in alanine aminotransferase (ALT) in OGT^{LKO} mice, while two other
360 markers of liver injury (aspartate aminotransferase (AST) and lactate dehydrogenase (LDH))
361 were not found statistically different between the two groups of mice (**Figure 1G**). The
362 expression of proliferation markers was also significantly induced in liver of OGT^{LKO} compared
363 to OGT^{LWT} mice (*Ki67*, *CycA2*, *CycB1*, *CycD1*) (**Figure 1H**). To investigate the potential
364 development of inflammation in the context of liver injury, we examined the expression of
365 inflammatory markers. Significant induction of *Tnf α* , *Mcp1* and *Ccl5* was observed in the liver
366 of OGT^{LKO} compared to OGT^{LWT} mice (**Figure 1I**). Analyses of serum pro-inflammatory
367 cytokines and chemokines levels in 4 week-old mice also revealed a significant increase in C-
368 X-C motif chemokine ligand 1 (Cxcl1) concentration (**Figure 1J**). Altogether, these results
369 reveal that constitutive hepatic deletion of OGT in mice rapidly triggers early signs of liver
370 injury, as illustrated by the onset of inflammation, apoptosis and moderate fibrosis at 4 weeks
371 of age.

372

373

374 **OGT^{LKO} mice exhibit necroptosis, extensive liver fibrosis and liver injury at 8 weeks.**

375 To determine whether the emerging phenotype of liver injury observed in 4 week old OGT^{LKO}
376 mice worsens with time, both male (**Figures 2 and Figure S2**) and female (**Figure S3**) OGT^{LKO}
377 mice were studied 8 weeks after birth. Similar blood glucose concentrations and body weights
378 were observed in 8 week-old male OGT^{LWT} and OGT^{LKO} mice (**Figure 2A**), while both liver
379 and spleen weights were significantly increased in OGT^{LKO} compared to OGT^{LWT} mice,
380 regardless of gender (**Figure 2A**). Interestingly, a dysmorphic liver with hepatic nodules together
381 with splenomegaly was observed macroscopically at sacrifice in a large proportion of OGT^{LKO}
382 mice (**Figure 2B**). Macroscopic view of histological liver section of OGT^{LKO} mice from Sirius
383 red staining showed a homogeneous distribution of these nodules, that were identified as
384 regeneration nodules typical of chronically injured livers (**Figures 2B and 2C**). Of note, clear
385 signs of advanced hepatic fibrosis were observed in OGT^{LKO} liver sections, regardless of the
386 presence of macroscopic regenerative nodules (**Figure S2D**). In agreement, mRNA levels of
387 fibrosis markers (*Col3a1*, *Col6a1*) were significantly increased in both male and female
388 OGT^{LKO} mice (**Figure 2D and Figure S3F**) and parallel Sirius red and α SMA staining showed
389 fibroblast activation and advanced fibrosis in OGT^{LKO} livers (**Figure 2G and Figure S3D**).
390 Surprisingly, analysis of OGT mRNA and protein levels revealed recovery of OGT expression
391 in liver of OGT^{LKO} mice compared to OGT^{LWT} mice, despite a less pronounced effect in females
392 than in males (**Figures 2E, 2F and Figure S3C**). However, OGT immunolabelling showed
393 OGT positive cells in OGT^{LKO} liver sections regardless of gender (**Figure 2G and Figure S3D**)
394 , suggesting counter-selection against OGT deficient cells during liver regeneration (Baker et
395 al., 2020). The emergence of TUNEL positive cells in OGT^{LKO} liver sections as well as Ki67
396 positive cells in hepatic tissue surrounding the regenerative nodules of OGT^{LKO} liver (**Figure**
397 **2G**) suggested an activation of both proliferation and apoptosis pathways. Accordingly, the
398 expression of proliferation markers was significantly induced in liver of OGT^{LKO} compared to

399 OGT^{LWT} mice at both mRNA (*Ki67*, *CycA2*, *CycB1*, *CycD1*) and protein levels (Cyclin A,
400 Cyclin D1, Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) (**Figure S2B** and **2C**). While the
401 expression of RIPK3 was unchanged in OGT^{LKO} livers, the expression of MLKL, another key
402 protein of necroptosis, was significantly increased (**Figure 2H**). In agreement, OGT^{LKO} mice
403 exhibited a significant increase in plasma ALT and LDH concentrations (**Figure 2I**), while the
404 circulating levels of AST, another marker of liver injury was unchanged (**Figure S3E**). The
405 expression of inflammatory markers (*Tnfα*, *Mcp1* and *Ccl5*) and plasma concentrations of
406 cytokines (TNFα, IL-2, IL-6) were also increased in liver of OGT^{LKO} mice compared to the
407 OGT^{LWT} control group (**Figures 2J** and **2K**). A similar phenotype comprising inflammation,
408 fibrosis and liver injury was observed in 8 week-old OGT^{LKO} female mice (**Figure S3D** and
409 **3H**). Therefore, either males and/or females were used in further experiments, as indicated in
410 the figure legends. Finally, we next investigated whether OGT^{LKO} liver alterations were
411 associated with early (4 weeks) or later (8 weeks) changes in cell identity following deletion of
412 hepatic OGT (**Figure S2F**). A marked increase in mRNA levels of progenitor cells and
413 cholangiocyte markers, *Krt7* and *Krt19*, was observed in livers of OGT^{LKO} compared to
414 OGT^{LWT} mice both both ages, despite differences were more pronounced at 8 weeks (**Figure**
415 **S2G**). Immunolabelling of HNF4α, SOX9 and Krt19 on liver sections confirmed a ductular
416 reaction, mostly localized in the fibrosis septa in older OGT^{LKO} mice (**Figure S2H**). While total
417 or direct bilirubin was not changed, a significant increase in serum alkaline phosphatase (ALP)
418 was measured in 8 week-old OGT^{LKO} compared to OGT^{LWT} mice (**Figure S2E**). Taken
419 together, our results suggest that OGT plays an important role in liver cell identity and that its
420 deficiency leads to a rapid deterioration of liver homeostasis in OGT^{LKO} mice.

421

422

423 **Hepatocyte OGT deletion leads to specific transcriptional changes in the liver from 4 and**
424 **8 week-old OGT^{LKO} mice.**

425 To better characterize the early and late consequences of hepatic OGT deficiency, we
426 performed a transcriptomic analysis on livers from 4 and 8 week old OGT^{LKO} and OGT^{LWT}
427 mice. Volcano plots, that were generated by using a total of 22206 hepatic genes and by
428 comparing OGT^{LKO} to OGT^{LWT} mice, demonstrated a shift in the expression levels of specific
429 genes between the two time-points studied (4 and 8 weeks) (**Figures 3A and 3B**). Venn diagram
430 (fold change $\geq |2|$, false discovery rate (FDR) p-value < 0.05) indicated that 557 and 493 genes
431 genes were differentially expressed (DE) at 4 and 8 weeks respectively, with 95 DE genes
432 common to 4 and 8 week old mice (**Figure 3C, Table S3**). Several genes clusters were
433 differentially regulated in OGT^{LKO} livers as compared to OGT^{LWT} at 4 and 8 weeks, as
434 illustrated by the heatmap analysis (**Figure 3D**). Analysis of REACTOME pathways in the liver
435 of 4 week-old mice showed a significant down-regulation in basic metabolic pathways such as
436 lipid, amino acid and vitamin metabolism (**Figure 3E**). Interestingly, the glutathione
437 metabolism pathway, an important detoxification pathway in the liver (Aquilano et al., 2014),
438 was also significantly down-regulated at this stage (**Figure 3E**). In parallel, the expression of
439 genes involved in immune signalling pathways and UDP-glucuronate formation, the latest
440 known to be activated during antioxidant response in the liver (Kalthoff et al., 2010), were up-
441 regulated at 4 weeks in OGT^{LKO} mice (**Figure 3F**). Surprisingly, analysis of DE genes at 8
442 weeks only reported up-regulated pathways. Up-regulation of genes involved in immune
443 system activation suggested that the inflammation response was not resolved at 8 weeks.
444 However, an up-regulation of pathways involved in liver injury and its resolution such as
445 formation and degradation of extracellular matrix (ECM) was observed (**Figures 3F and Figure**
446 **S4D**). Altogether, the results indicate specific changes in global mRNA expression occurring

447 between 4 and 8 weeks, indicating early and major molecular adaptations in the liver to cope
448 with the loss of hepatic OGT.

449

450 **OGT deficiency in hepatocytes leads to oxidative stress, ER stress and enhanced**
451 **sensitivity to cell death.**

452 Since the transcriptomic analysis revealed that a cluster of DE genes involved in the oxidative
453 stress response was significantly up-regulated in OGT^{LKO} livers at 4 weeks (**Figure S4A**), we
454 performed experiments in primary hepatocytes isolated from 4 week-old OGT^{LKO} mice.
455 Interestingly, the GSH/GSSG ratio, a reliable indicator of oxidative stress, was significantly
456 decreased in OGT^{LKO} compared to OGT^{LWT} hepatocytes, supporting enhanced hepatic
457 oxidative stress response in 4 week-old OGT^{LKO} mice (**Figure 4A**). Because oxidative stress
458 response involves binding of NRF2 (Nuclear factor erythroid-derived 2-related factor 2) on
459 ARE (anti-oxidant response element) located on promoters of anti-oxidant response genes, we
460 monitored NRF2 activity in OGT^{LKO} and OGT^{LWT} hepatocytes, by using an ARE luciferase
461 reporter construct (Wang et al., 2006). ARE luciferase activity was increased by 7-fold in
462 OGT^{LKO} hepatocytes compared to OGT^{LWT}, suggesting that the NRF2 antioxidant response was
463 induced in the absence of OGT (**Figure 4B**). In agreement, an increase in p-p62 (autophagy
464 related oxidative stress) (Cho et al., 2018; Manley et al., 2013), γ H2AX (DNA damage) and
465 CHOP (ER stress-derived apoptosis) was observed in hepatocytes from OGT deficient cells
466 compared to OGT^{LWT} hepatocytes (**Figure 4C**). To further characterize oxidative stress in
467 OGT^{LKO} hepatocytes, total ROS (reactive oxygen species) and total lipid peroxidation were
468 assayed by CellROX and BODIPY assays. Both parameters were found significantly increased
469 in OGT^{LKO} hepatocytes compared to OGT^{LWT} (**Figures 4D** and **4E**). Sensitivity of OGT^{LKO}
470 hepatocytes to oxidative stress-dependent apoptosis was next evaluated over an 8 hour time-
471 course in primary hepatocytes treated with staurosporine (StS) (Belmokhtar et al., 2001)

472 **(Figure 4F)**. Higher levels of cleaved caspase-3, a marker of apoptosis, was observed in OGT
473 deficient cells compared to OGT^{LWT} hepatocytes upon StS treatment, indicating enhanced
474 sensitivity to StS-induced cell death **(Figure 4F)**. Similarly, sensitivity to ER-stress induced
475 apoptosis was also enhanced in OGT^{LKO} compared to OGT^{LWT} hepatocytes, as illustrated by
476 significant higher levels of cleaved caspase-3 observed upon thapsigargin treatment (24 hours)
477 **(Figure 4G)**. Altogether, these data demonstrate that OGT deficiency promotes early oxidative
478 and ER stress, leading to DNA damage and increased hepatocyte sensitivity to cell death.

479

480 **OGT^{LKO} mice display extensive and prolonged hepatic fibrosis in response to early**
481 **oxidative and ER stress**

482 Aiming at better characterizing the phenotype of oxidative and ER stress in the OGT^{LKO} mice
483 *in vivo*, we measured oxidative stress markers by qPCR in liver of 4 and 8 week-old OGT^{LKO}
484 mice **(Figure 5)**. These results confirmed a set of genes significantly induced at 4 weeks (*Nqo1*,
485 *Gstm1*, *Gstm3*, *Gsta1*) but also at 8 weeks in liver of OGT^{LKO} mice, although to a lesser extent
486 at 8 weeks than at 4 weeks **(Figures 5A and 5B)**. Similar changes were observed at the protein
487 level for mediators of the oxidative/ER stress response (p-62, CHOP) and of DNA damage
488 (γ H2AX) **(Figures 5C and 5D)**. To better characterize the phenotype observed in OGT^{LKO}
489 mice, we performed kinetic experiments and included an earlier time point (2 weeks) **(Figure**
490 **S5)**. Inflammation state occurred as early as 2 weeks after birth, with evidence of increased
491 phosphorylation of c-Jun N-terminal kinase (JNK) in liver of 2 week-old OGT^{LKO} mice **(Figure**
492 **S5A)**. Of note, mRNA levels of oxidative stress (*Nqo1*, *Gstm1*, *Gstm3*) and ER stress markers
493 (*Chop*) were significantly increased later on, between 4 and 8 weeks after birth **(Figures S5A**
494 **and S5B)**. However, staining with malondialdehyde (MDA), a commonly used marker for lipid
495 peroxidation (Paradis et al., 1997), revealed positive staining on liver sections from 8 week-old
496 OGT^{LKO} compared to OGT^{LWT} mice, confirming sustained hepatic stress at this stage of

497 development (**Figure 5E**). Finally, to better characterize the long term progression of hepatic
498 damages in OGT^{LKO} mice, we followed mice up to 12 months, and sacrificed them at specific
499 time points (8, 12 weeks and 12 months). While the expression of oxidative stress and
500 inflammation markers was found increased in livers of OGT^{LKO} compared to OGT^{LWT} mice at
501 12 weeks, no difference between the two genotypes was observed when the mice were analysed
502 at 12 months (**Figure S6B** and **6D**). In contrast, Sirius red staining revealed marked residual
503 hepatic fibrosis in both 12 week-old and 12 month-old OGT^{LKO} mice (**Figure 5F**). In
504 agreement, ALT serum levels were significantly increased in 12 week-old and 12 month-old
505 OGT^{LKO} mice compared to controls (**Figure S6E**). Taken together, these data suggest that
506 inflammation and oxidative stress are early triggering events of the the OGT^{LKO} phenotype
507 peaking between 2 and 4 weeks, respectively. However, the rest of hepatic alterations of
508 OGT^{LKO} mice (namely fibrosis and liver injury) persisted over time.

509

510 **Low carbohydrate high fat (LCHF) diet prevents hepatic oxidative, ER stress, and DNA** 511 **damage in OGT^{LKO} mice.**

512 During the suckling period, pups receive a low carbohydrate high-fat diet that switches to a
513 standard chow diet (SD) containing nearly 70% of carbohydrates at weaning. Because no
514 oxidative stress was observed in livers of 2 week-old OGT^{LKO} mice, i.e. during the suckling
515 period, we hypothesized that the elevated oxidative stress observed at 4 weeks could result from
516 elevated carbohydrate content in the diet at weaning. Therefore, OGT^{LWT} and OGT^{LKO} mice
517 were weaned and maintained for 5 weeks either on a standard diet (SD: 69% of carbohydrates,
518 4% of fat, 26% of proteins) or on a low carbohydrate diet compensated by lipid enhancement
519 (LCHF: 21% of carbohydrates, 60% of fat, 19% of proteins) (**Figures 6** and **Figure S7A**).
520 Induction of oxidative stress markers (*Gsta1*, *Gstm3*) in liver of OGT^{LKO} compared to OGT^{LWT}
521 mice on standard diet (OGT^{LKO} SD vs OGT^{LWT} SD) was significantly reduced when OGT^{LKO}

522 mice were fed with LCHF (OGT^{LKO} LCHF) (**Figure 6A**). Interestingly, the expression of ER
523 stress marker (CHOP) and DNA damage markers (γ H2AX) was also reduced in liver of
524 OGT^{LKO} LCHF mice when compared to OGT^{LKO} SD (**Figures 6B-D and Figure S7D**). OGT
525 immunostaining revealed significant staining in liver sections from OGT^{LKO} mice regardless of
526 the nutritional conditions (**Figure 6E**) in agreement with the re-expression observed on SD diet
527 (**Figures 2E and 2F**). Histological analysis of liver ballooning (HE), inflammation (F4/80),
528 ductular reaction (SOX9, Krt7), and fibrosis (Sirius red) showed no evidence of improvement
529 upon LCHF conditions (**Figure 6E**). Quantification of fibrosis revealed similar hepatic fibrosis
530 in OGT^{LKO} mice compared to OGT^{LWT} under either SD or LCHF diet (**Figure 6F**). In
531 agreement, the expression of inflammatory markers (*Tnfa*, *Mcp1*) and fibrosis markers (*Col3a1*
532 and *Col6a1*) was found similarly increased in livers of OGT^{LKO} mice compared to OGT^{LWT} in
533 both nutritional challenges (**Figures 6H and 6G**). Nevertheless, a significant reduction in liver
534 injury marker ALT was observed when OGT^{LKO} mice were weaned on a LCHF diet (**Figure**
535 **6I**) and a tendency in reduced circulating levels of inflammatory cytokine Cxcl1 (**Figure S7E**).
536 Since specific lipids could contribute to oxidative stress and/or ER stress, the hepatic lipidomic
537 profiling (including triglycerides, cholesterol, sphingolipids and fatty acids) of LCHF vs SD
538 fed mice was performed (**Figure S9A**). Lipidomic analysis revealed that the majority of lipid
539 species changes was due to the dietary change rather than to the genotype (clusters 1, 2, 4 and
540 5; **Figure S9A**). However, clusters 3 and 7 highlighted lipid signatures were respectively more
541 (cluster 3) and less abundant (cluster 7) in OGT^{LKO} mice fed a LCHF diet compared to SD.

542 Taken together, these results suggest that while weaning OGT^{LKO} mice on a LCHF diet
543 improved some parameters of liver damages (oxidative stress, ER stress and DNA damage), it
544 failed to fully prevent hepatic alterations, such as ballooning, inflammation, ductular reaction
545 and fibrosis.

546

547 Ketogenic diet prevents the hepatic alterations of OGT^{LKO} mice

548 Since the LCHF diet still contains 21% of carbohydrates, we hypothesized that further
549 decreasing the carbohydrate content in the diet could improve the severe liver damage in
550 OGT^{LKO} mice. Therefore, OGT^{LWT} and OGT^{LKO} mice were challenged at weaning with a
551 ketogenic diet for 5 weeks (KD: 1% of carbohydrates, 94% of fat, 5% of protein) (**Figure S8A**).
552 The significant induction of oxidative stress markers (*Gsta1*, *Gstm3*) in liver of OGT^{LKO} mice
553 compared to OGT^{LWT} controls on standard diet (OGT^{LKO} SD vs OGT^{LWT} SD) was significantly
554 reduced when OGT^{LKO} mice were weaned on KD (**Figure 7A**). Because oxidative stress has
555 been shown to promote hyper-polyploidization of hepatocytes (Gentric et al., 2015), we
556 quantified highly polyploid ($\geq 8n$) mononuclear hepatocytes relative to total hepatocytes in each
557 group of mice. While the number of highly polyploid hepatocytes was significantly increased
558 in liver of OGT^{LKO} SD mice when compared to OGT^{LWT} SD control (**Figure 7B**), no difference
559 was observed between OGT^{LKO} and to OGT^{LWT} when fed on KD (**Figure 7B**), demonstrating
560 that KD prevents the oxidative stress response upon hepatic OGT deficiency. The expression
561 of ER stress (CHOP) and DNA damage (γ H2AX) markers was also significantly reduced in the
562 liver of OGT^{LKO} KD mice when compared to OGT^{LKO} SD (**Figures 7C-E** and **Figure S8D**).
563 OGT immunostaining revealed significant staining in liver sections from OGT^{LKO} mice
564 regardless of the nutritional conditions (**Figure 7F**). Of note, in contrast to the histological
565 observations made on a LCHF diet, liver ballooning (HE), inflammation (F4/80), ductular
566 reaction (SOX9, Krt7), and fibrosis (Sirius red) were markedly improved in OGT^{LKO} mice upon
567 KD conditions (**Figure 7F**). Quantification of fibrosis accordingly revealed a statistical
568 decrease in hepatic fibrosis in OGT^{LKO} KD mice compared to OGT^{LKO} SD (**Figure 7G**). In
569 agreement, the expression of fibrosis markers (*α Sma*, *Col3a1* and *Col6a1*) was found similarly
570 decreased in livers of OGT^{LKO} KD mice compared to OGT^{LKO} SD (**Figure 7H**). F4/80 staining
571 show a marked reduction in liver section from OGT^{LKO} KD mice compared to OGT^{LKO} SD

572 **(Figure 7F)**. Lastly, a significant difference was observed for liver injury marker ALT when
573 OGT^{LKO} mice were weaned on a KD diet **(Figure 7J)**. Interestingly, we also observed that
574 specific hepatic lipid species previously associated with liver apoptosis and fibrosis (ceramides
575 C24:0, C24:1) (Shmarakov et al., 2019; Pewzner-Jung et al., 2010) were no longer increased
576 when OGT^{LKO} were weaned on KD **(Figure S9B)**. Altogether, these results show that weaning
577 on a KD fully prevented the phenotype of the OGT^{LKO} mice (oxidative stress, polyploidy, ER
578 stress, inflammation, fibrosis and liver injury).

579

580 **Discussion**

581 In liver, O-GlcNAcylation has emerged as an important regulatory mechanism underlying
582 normal liver physiology and metabolic disease (Yang and Qian, 2017). We previously reported
583 that O-GlcNAcylation of two key transcription factors involved in glucose and lipid metabolism
584 (i.e. ChREBP and Foxo1) significantly contributes to gluco-lipotoxicity in hepatocytes (Guinez
585 et al., 2011; Kuo et al., 2008). However, the function of OGT in liver sensing appears rather
586 complex since other studies reported that OGT is rather involved in the survival and death
587 balance in hepatocytes, and also suggested that OGT acts as a critical modulator of hepatocytes
588 homeostasis in the context of liver injury and/or chronic liver diseases (Zhang et al., 2019;
589 Robarts et al., 2022).

590 To better understand the importance of O-GlcNAcylation signalling in hepatocytes, we
591 generated mice with a liver-specific constitutive deletion of OGT (OGT^{LKO} mice) and examined
592 their phenotype over a time course ranging from 2 weeks to 1 year upon different dietary
593 challenges. Our specific goal was to address whether the lack of OGT could lead to oxidative
594 stress and associated-liver injuries in a diet-dependent manner. We first evaluated glucose
595 homeostasis parameters and observed a significant decrease in fasting blood glucose levels, as
596 well as an improvement in both glucose and pyruvate tolerances when comparing OGT^{LKO} to

597 OGT^{LWT} mice at 4 weeks of age. In agreement, the expression of gluconeogenic genes was
598 significantly decreased in OGT^{LKO} liver. Interestingly, the O-GlcNAcylation of Foxo1, a
599 modification previously shown to regulate its transcriptional activity towards its target
600 gluconeogenic genes (Kuo et al., 2008; Housley et al., 2008) was significantly decreased in
601 liver of 4 week-old OGT^{LKO} compared to OGT^{LWT} mice. However, despite improvement in
602 metabolic homeostasis, clear signs of liver injury were already detectable at 4 weeks with a
603 significant increase in proliferation markers, elevated inflammation and moderate fibrosis,
604 suggesting a critical role for OGT in preventing hepatocyte insult. Indeed, experiments in
605 cultured OGT^{LKO} hepatocytes also confirmed oxidative stress, the later evidenced by a
606 significant decrease in the GSH/GSSG ratio, elevated total ROS production as well as lipid
607 peroxidation. Follow-up analysis of OGT^{LKO} mice demonstrated the development of
608 hepatomegaly, advanced fibrosis and cholestasis, features that persisted in one year-old
609 OGT^{LKO} mice, and that are usually seen in bile duct ligation models (Geerts et al., 2008).
610 Importantly, this severe hepatic phenotype was observed in both male and female OGT^{LKO}
611 mice, underlining the importance of using both genders in experimental research to better
612 understand how and why some diseases and conditions affect men and women differently.
613 Interestingly, while recent studies have revealed the existence of sexual dimorphisms in liver
614 diseases, in particular in Non-Alcoholic Fatty liver disease (NAFLD) and fibrosis onset
615 (Lefebvre and Staels 2021; Smati et al., 2022), we could not see any significant evidence when
616 comparing the phenotype of OGT^{LKO} males to OGT^{LKO} females.

617 The phenotype of liver OGT deficiency in hepatocytes also led to changes in cell identity
618 profile, probably favouring the differentiation of hepatoblasts to cholangiocytes, typical of the
619 ductular reaction produced in the initial steps of liver regeneration (Roskams et al., 2004).
620 Interestingly, higher number of highly polyploid hepatocytes was observed in liver of 8 week-
621 old OGT^{LKO} mice. While polyploidization can represent a gain of function by contributing to

622 tissue differentiation, we believe that the hyperpolyploidization observed was caused by
623 extensive cellular stress and can be considered here as a pathological lesion, as previously
624 suggested in other mouse models of hepatic oxidative stress (Gentric et al., 2015; Donne et al.,
625 2020).

626 A surprising observation was the partial recovery of OGT expression at 8 weeks of age
627 in livers of OGT^{LKO} mice. A similar phenomenon, which could be linked to counter-selection
628 (Baker, 2020) of OGT-expressing cells, has already been described for other liver specific gene
629 knock-out models (Yamaji et al., 2010; Zhang et al., 2010; Grindheim et al., 2019). Indeed,
630 hepatocytes deficient in OGT may encounter difficulties to survive in an oxidative and
631 inflammatory environment and enter a process of cell death, while hepatocytes escaping to the
632 recombination process will repopulate the liver with cells expressing OGT protein. In
633 agreement with this hypothesis, higher sensitivity to cell death-inducers was observed in
634 OGT^{LKO} compared to OGT^{LWT} hepatocytes. This increased susceptibility to cell death upon
635 defective O-GlcNAcylation is consistent with the significant necroptosis observed following
636 liver OGT deletion (Zang et al., 2019), and with enhanced necroptosis and apoptosis in liver of
637 OGT deficient mice after partial hepatectomy (Robarts et al., 2022). Several other mouse
638 models with liver-specific deficiency in proteins involved in DNA damage, such as Damage
639 specific DNA binding protein 1 (DDB1) (Yamaji et al., 2010), liver regeneration, such as Yes-
640 associated protein (YAP) (Zhang et al., 2010), or epigenetic modulation, such as Enhancer of
641 zeste homolog (EZH) 1/EZH2 (Grindheim et al., 2019), exhibited a phenomenon of cell
642 competition and recovery of expression of the targeted protein. However, the exact number of
643 cells that escapes recombination and the mechanisms involved in OGT recovery were not
644 clearly identified in the current study, and further analysis, including single cell RNAseq
645 analysis of OGT^{LKO} hepatocytes will be necessary to investigate these important questions. It
646 should be also mentioned that hepatic recovery of OGT was only partial in some of the groups

647 studied, as observed in livers of female OGT^{LKO} mice. The OGT recovery was not previously
648 described in the published model of OGT liver knock-out mice (Zhang et al., 2019), but OGT
649 expression in OGT^{LKO} mice was only documented at the age of 4 weeks in this study.

650 We believe that our study describes here a valuable and timely mouse model of
651 spontaneous fibrosis that may facilitate therapeutic target identification for prevention and
652 treatment of chronic liver disease. Indeed, induction of hepatic fibrosis in rodents requires the
653 use of chemicals or specific diets, that while commonly used, often lack ease of use and
654 appropriate relevance to human liver fibrosis (Yanguas et al., 2016). While efforts towards
655 providing a better understanding of the mechanisms associated with fibrosis progression and/or
656 regression are being made, no approved drugs are currently available for liver fibrosis *per se*.
657 Interestingly, recent studies have highlighted that intrinsic metabolism of parenchymal cells,
658 immune cells and/or hepatic stellate cells is important to sustain energetic needs of phenotypic
659 changes in the context of fibrosis (Gilgenkrantz et al., 2021). In an attempt to decrease
660 carbohydrate intake in OGT^{LKO} mice and to reduce oxidative stress associated with lack of
661 OGT in liver, we first took the strategy to wean OGT^{LKO} mice on a LCHF diet in which the
662 carbohydrate percentage is reduced by over 3-fold when compared to SD diet (69% of
663 carbohydrates in SD vs. 21% in LCHF). This dietary switch while improving several parameters
664 including oxidative stress and ER stress, did not correct the other liver alterations such as
665 ballooning, macrophage infiltration, ductular reaction and fibrosis. However, when
666 carbohydrate concentrations in the diet were further reduced and restricted to 1% in KD, full
667 prevention of oxidative stress, hyperpolyploidy, inflammation and more importantly fibrosis
668 and liver injury was observed. Of course, in the context of this nutritional switch, a protective
669 role for lipids cannot be excluded, and in fact the combination of lowering carbohydrate intake
670 and modulating specific lipid species could have been instrumental in the beneficial effects
671 observed. Indeed, lipidomics analysis from LCHF and KD experiments revealed that OGT^{LKO}

672 mice exhibited high abundance of specific bioactive species including ceramides C24:0 and
673 C24:1 under SD conditions, species which remain low upon KD conditions, suggesting that
674 reduction in these ceramide moieties could contribute, at least in part, to the protective effect
675 of KD on OGT^{LKO} mice. In addition, LCHF and KD also differ in their capacity to produce
676 ketone bodies, especially β -hydroxybutyrate (**Figure S7C** and **Figure S8C**) a signalling
677 metabolite with protective properties against oxidative stress (Rojas-Morales et al., 2020).
678 While ketone body metabolism can induce oxidative stress, it was reported beneficial in the
679 long term because it initiates an adaptive response characterized by the activation of the master
680 regulators of cell-protective mechanism, including NRF2 (Kolb et al., 2021). This results in
681 resolving oxidative stress, by the upregulation of anti-oxidative and anti-inflammatory
682 activities, improved mitochondrial function, DNA repair and autophagy. In agreement, studies
683 have hypothesized that activation of ketogenesis in the liver could potentially attenuate ROS-
684 mediated NASH progression (Rojas-Morales et al., 2020).

685 Altogether, our study shows that hepatocyte-specific deletion of OGT leads to severe
686 liver injury, confirming that O-GlcNAcylation and OGT are essential for hepatocytes
687 homeostasis and survival. Our study also validates the OGT^{LKO} mouse model as a valuable
688 model for the study of advanced liver fibrosis. Given that the severe fibrosis of OGT^{LKO} mice
689 was fully prevented when mice were weaned on a very low carbohydrate high fat diet (i.e;
690 ketogenic diet), our study underlines the potential interest of nutritional intervention as an anti-
691 fibrogenic strategy.

692

693 **Acknowledgements**

694 The authors would like to thank Dr. Hélène Gilgenkrantz and Pr. Valérie Paradis (Centre de
695 Recherche sur l'Inflammation (CRI), Université Paris Cité) for helpful discussions. We also
696 would like to thank the Animal Facility from the Institut Cochin Inserm U1016, and in

697 particular Mathieu Benard for taking excellent care of the mice. We also thank the Institut
698 Cochin platforms: the Genomic platform (GENOM'IC), the Cytometry and Immunobiology
699 platform (CYBIO), the "Imagerie du vivant platform" (PIV) (Isabelle Lagoutte Franck Lager
700 and Gilles Renault) and the Microscopy Platform (Thomas Guilbert) for fibrosis quantification.
701 Lipidomic profiling was done in MetaToul-Lipidomique Core Facility (I2MC, Inserm 1297,
702 Toulouse, France) from MetaToul (Toulouse metabolomics & fluxomics facilities,
703 www.metatoul.fr) which is part of the French National Infrastructure for Metabolomics and
704 Fluxomics MetaboHUB-ANR-11-INBS-0010.

705

706 **Author contributions**

707 P.O-P and L.P performed most the experiments with the help of F.B, M.R, I.C, M.M, N.P, J.M,
708 P.P and M.C. R.O and M. F (HistIM Platform, Institut Cochin) performed liver sections and
709 liver immunostaining. P.O-P analysed and interpreted the results from the microarray data. C.P,
710 T.I, P.O-P, L.P prepared the figures and wrote the manuscript. J.G, C.D and SG provided
711 scientific advice and critical reading of the manuscript. C.P and T.I conceptualized and
712 supervised the project.

713 **Declaration of interests**

714 The authors declare no conflicts of interest.

715

716 **References**

- 717 Aquilano K, Baldelli S, Ciriolo MR. Glutathione: new roles in redox signaling for an old
718 antioxidant. *Front Pharmacol*. 2014 Aug 26;5:196. doi: 10.3389/fphar.2014.00196. PMID:
719 25206336; PMCID: PMC4144092.
- 720 Baker NE. Emerging mechanisms of cell competition. *Nat Rev Genet*. 2020 Nov;21(11):683-
721 697. doi: 10.1038/s41576-020-0262-8. Epub 2020 Aug 10. Erratum in: *Nat Rev Genet*. 2020
722 Aug 28;: PMID: 32778819; PMCID: PMC8205513.
- 723 Belmokhtar CA, Hillion J, Ségal-Bendirdjian E. Staurosporine induces apoptosis through both
724 caspase-dependent and caspase-independent mechanisms. *Oncogene*. 2001 Jun 7;20(26):3354-
725 62. doi: 10.1038/sj.onc.1204436. PMID: 11423986.
- 726 Chen PH, Chi JT, Boyce M. Functional crosstalk among oxidative stress and O-GlcNAc
727 signaling pathways. *Glycobiology*. 2018 Aug 1;28(8):556-564. doi: 10.1093/glycob/cwy027.
728 PMID: 29548027; PMCID: PMC6054262.
- 729 Cho CS, Park HW, Ho A, et al. Lipotoxicity induces hepatic protein inclusions through
730 TANK binding kinase 1-mediated p62/sequestosome 1 phosphorylation. *Hepatology*. 2018
731 Oct;68(4):1331-1346. doi: 10.1002/hep.29742. Epub 2018 May 21. PMID: 29251796;
732 PMCID: PMC6005718
- 733 de Carvalho Vidigal F, Guedes Cocate P, et al. The role of hyperglycemia in the induction of
734 oxidative stress and inflammatory process. *Nutr Hosp*. 2012 Sep-Oct;27(5):1391-8. doi:
735 10.3305/nh.2012.27.5.5917. PMID: 23478683.
- 736 Dickinson S, Hancock DP, Petocz P, et al. High-glycemic index carbohydrate increases nuclear
737 factor-kappaB activation in mononuclear cells of young, lean healthy subjects. *Am J Clin Nutr*.
738 2008 May;87(5):1188-93. doi: 10.1093/ajcn/87.5.1188. PMID: 18469238.
- 739 Donne R, Saroul-Aïnama M, Cordier P, et al.. Polyploidy in liver development, homeostasis

- 740 and disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2020 Jul;17(7):391-405. doi: 10.1038/s41575-
741 020-0284-x. Epub 2020 Apr 2. PMID: 32242122.
- 742 Du D, Shi YH, Le GW. Oxidative stress induced by high-glucose diet in liver of C57BL/6J
743 mice and its underlying mechanism. *Mol Biol Rep*. 2010 Dec;37(8):3833-9. doi:
744 10.1007/s11033-010-0039-9. Epub 2010 Mar 9. PMID: 20217240.
- 745 Geerts AM, Vanheule E, Praet M, et al. Comparison of three research models of portal
746 hypertension in mice: macroscopic, histological and portal pressure evaluation. *Int J Exp*
747 *Pathol*. 2008 Aug;89(4):251-63. doi: 10.1111/j.1365-2613.2008.00597.x. PMID: 18715470;
748 PMCID: PMC2525776.
- 749 Gentric G, Maillet V, Paradis V, et al.. Oxidative stress promotes pathologic polyploidization
750 in nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Invest*. 2015 Mar 2;125(3):981-92. doi:
751 10.1172/JCI73957. Epub 2015 Jan 26. PMID: 25621497; PMCID: PMC4362240
- 752 Gilgenkrantz H, Mallat A, Moreau R, et al. Targeting cell-intrinsic metabolism for antifibrotic
753 therapy. *J Hepatol*. 2021 Jun;74(6):1442-1454. doi: 10.1016/j.jhep.2021.02.012. Epub 2021
754 Feb 22. PMID: 33631228.
- 755 Grindheim JM, Nicetto D, Donahue G, et al. Polycomb Repressive Complex 2 Proteins EZH1
756 and EZH2 Regulate Timing of Postnatal Hepatocyte Maturation and Fibrosis by Repressing
757 Genes With Euchromatic Promoters in Mice. *Gastroenterology*. 2019 May;156(6):1834-1848.
758 doi: 10.1053/j.gastro.2019.01.041. Epub 2019 Jan 25. PMID: 30689973; PMCID:
759 PMC6599454.
- 760 Guilbert T, Odin C, Le Grand Y, et al. A robust collagen scoring method for human liver
761 fibrosis by second harmonic microscopy. *Opt Express*. 2010 Dec 6;18(25):25794-807. doi:
762 10.1364/OE.18.025794. PMID: 21164924.
- 763 Guinez C, Filhoulaud G, Rayah-Benahmed F, et al. C. O-GlcNAcylation increases ChREBP

- 764 protein content and transcriptional activity in the liver. *Diabetes*. 2011 May;60(5):1399-413.
765 doi: 10.2337/db10-0452. Epub 2011 Apr 6. PMID: 21471514; PMCID: PMC3292313.
- 766 Housley MP, Rodgers JT, Udeshi ND, et al. O-GlcNAc regulates FoxO activation in response
767 to glucose. *J Biol Chem*. 2008 Jun 13;283(24):16283-92. doi: 10.1074/jbc.M802240200. Epub
768 2008 Apr 17. PMID: 18420577; PMCID: PMC2423255
- 769 Kalthoff S, Ehmer U, Freiberg N, et al. Interaction between oxidative stress sensor Nrf2 and
770 xenobiotic-activated aryl hydrocarbon receptor in the regulation of the human phase II
771 detoxifying UDP-glucuronosyltransferase 1A10. *J Biol Chem*. 2010 Feb 26;285(9):5993-6002.
772 doi: 10.1074/jbc.M109.075770. Epub 2010 Jan 6. PMID: 20053997; PMCID: PMC2825393
- 773 Kolb H, Kempf K, Röhling M, et al. Ketone bodies: from enemy to friend and guardian angel.
774 *BMC Med*. 2021 Dec 9;19(1):313. doi: 10.1186/s12916-021-02185-0. PMID: 34879839;
775 PMCID: PMC8656040.
- 776 Kuo M, Zilberfarb V, Gangneux N, et al. O-glycosylation of FoxO1 increases its transcriptional
777 activity towards the glucose 6-phosphatase gene. *FEBS Lett*. 2008 Mar 5;582(5):829-34. doi:
778 10.1016/j.febslet.2008.02.010. Epub 2008 Feb 14. PMID: 18280254.
- 779 Lefebvre P, Staels B. Hepatic sexual dimorphism - implications for non-alcoholic fatty liver
780 disease. *Nat Rev Endocrinol*. 2021 Nov;17(11):662-670. doi: 10.1038/s41574-021-00538-6.
781 Epub 2021 Aug 20. PMID: 34417588.
- 782 Manley S, Williams JA, Ding WX. Role of p62/SQSTM1 in liver physiology and pathogenesis.
783 *Exp Biol Med (Maywood)*. 2013 May;238(5):525-38. doi: 10.1177/1535370213489446.
784 PMID: 23856904; PMCID: PMC4096157.
- 785 Mohanty P, Hamouda W, Garg R, et al. Glucose challenge stimulates reactive oxygen species
786 (ROS) generation by leucocytes. *J Clin Endocrinol Metab*. 2000 Aug;85(8):2970-3. doi:
787 10.1210/jcem.85.8.6854. PMID: 10946914.

- 788 Nie H, Yi W. O-GlcNAcylation, a sweet link to the pathology of diseases. *J Zhejiang Univ Sci*
789 *B*. 2019 May;20(5):437-448. doi: 10.1631/jzus.B1900150. PMID: 31090269; PMCID:
790 PMC6568225.
- 791 Paradis V, Kollinger M, Fabre M, et al. In situ detection of lipid peroxidation by-products in
792 chronic liver diseases. *Hepatology*. 1997 Jul;26(1):135-42. doi:
793 10.1053/jhep.1997.v26.pm0009214462. PMID: 9214462
- 794 Park SK, Zhou X, Pendleton KE, et al. A Conserved Splicing Silencer Dynamically Regulates
795 O-GlcNAc Transferase Intron Retention and O-GlcNAc Homeostasis. *Cell Rep*. 2017 Aug
796 1;20(5):1088-1099. doi: 10.1016/j.celrep.2017.07.017. PMID: 28768194; PMCID:
797 PMC5588854.
- 798 Robarts DR, McGreal SR, Umbaugh DS, et al. Regulation of Liver Regeneration by Hepatocyte
799 O-GlcNAcylation in Mice. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*. 2022;13(5):1510-1529. doi:
800 10.1016/j.jcmgh.2022.01.014. Epub 2022 Jan 28. PMID: 35093590; PMCID: PMC9043307
- 801 Rojas-Morales P, Pedraza-Chaverri J, Tapia E. Ketone bodies, stress response, and redox
802 homeostasis. *Redox Biol*. 2020 Jan;29:101395. doi: 10.1016/j.redox.2019.101395. Epub 2019
803 Nov 28. PMID: 31926621; PMCID: PMC6911969.
- 804 Roskams TA, Theise ND, Balabaud C, et al. Nomenclature of the finer branches of the biliary
805 tree: canals, ductules, and ductular reactions in human livers. *Hepatology*. 2004
806 Jun;39(6):1739-45. doi: 10.1002/hep.20130. PMID: 15185318.
- 807 Shafi R, Iyer SP, Ellies LG, et al. The O GlcNAc transferase gene resides on the X chromosome
808 and is essential for embryonic stem cell viability and mouse ontogeny. *Proc Natl Acad Sci U S*
809 *A*. 2000 May 23;97(11):5735-9. doi: 10.1073/pnas.100471497. PMID: 10801981; PMCID:
810 PMC18502.
- 811 Shmarakov IO, Jiang H, Liu J, et al. Hepatic stellate cell activation: A source for bioactive

- 812 lipids. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*. 2019 May;1864(5):629-642. doi:
813 10.1016/j.bbalip.2019.02.004. Epub 2019 Feb 5. PMID: 30735856; PMCID: PMC6414233.
- 814 Smati S, Polizzi A, Fougerat A, et al. Integrative study of diet-induced mouse models of
815 NAFLD identifies PPAR α as a sexually dimorphic drug target. *Gut*. 2022 Apr;71(4):807-821.
816 doi: 10.1136/gutjnl-2020-323323. Epub 2021 Apr 26. PMID: 33903148
- 817 Toda G, Ikeda Y, Kako M, et al. Mechanism of elevation of serum alkaline phosphatase activity
818 in biliary obstruction: an experimental study. *Clin Chim Acta*. 1980 Oct 23;107(1-2):85-96.
819 doi: 10.1016/0009-8981(80)90417-9. PMID: 7428180. Wang XJ, Hayes JD, Wolf CR.
820 Generation of a stable antioxidant response element-driven reporter gene cell line and its use to
821 show redox-dependent activation of nrf2 by cancer chemotherapeutic agents. (2006) *Cancer Res*.
822 15;66(22):10983-94. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-2298.
- 823 Wang XJ, Hayes JD, Wolf CR. Generation of a stable antioxidant response element-driven
824 reporter gene cell line and its use to show redox-dependent activation of nrf2 by cancer
825 chemotherapeutic agents. *Cancer Res*. 2006 Nov 15;66(22):10983-94. doi: 10.1158/0008-
826 5472.CAN-06-2298. PMID: 17108137.
- 827 Yanguas SC, Cogliati B, Willebrords J, et al. Experimental models of liver fibrosis. *Arch*
828 *Toxicol*. 2016 May;90(5):1025-1048. doi: 10.1007/s00204-015-1543-4. Epub 2015 Jun 6.
829 PMID: 26047667; PMCID: PMC4705434.
- 830 Yamaji S, Zhang M, Zhang J, et al. Hepatocyte-specific deletion of DDB1 induces liver
831 regeneration and tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Dec 21;107(51):22237-42.
832 doi: 10.1073/pnas.1015793108. Epub 2010 Dec 6. PMID: 21135245; PMCID: PMC3009836.
- 833 Yang X, Qian K. Protein O-GlcNAcylation: emerging mechanisms and functions. *Nat Rev Mol*
834 *Cell Biol*. 2017 Jul;18(7):452-465. doi: 10.1038/nrm.2017.22. Epub 2017 May 10. PMID:
835 28488703; PMCID: PMC5667541.

836 Zhang B, Li MD, Yin R, et al. O-GlcNAc transferase suppresses necroptosis and liver fibrosis.

837 JCI Insight. 2019 Nov 1;4(21):e127709. doi: 10.1172/jci.insight.127709. PMID: 31672932;

838 PMCID: PMC6948774.

839 Zhang N, Bai H, David KK, et al. The Merlin/NF2 tumor suppressor functions through the YAP

840 oncoprotein to regulate tissue homeostasis in mammals. Dev Cell. 2010 Jul 20;19(1):27-38.

841 doi: 10.1016/j.devcel.2010.06.015. PMID: 20643348; PMCID: PMC2925178.

842

843

844

845

846

847

848

849

850

851

Journal Pre-proof

852 **Figures Legends**

853

854 **Figure 1. Hepatocyte-specific OGT deletion leads to liver inflammation and moderate**
855 **liver injury at 4 weeks.**

856 Male liver-specific *Ogt* knockout (OGT^{LKO}) and control floxed littermates (OGT^{LWT}) mice were
857 studied 4 weeks after birth in the fed state. **A.** Fed blood glucose (mmol/L), body (g), liver and
858 spleen weights are shown. Liver and spleen weights are represented as percentage of body
859 weight. **B.** Relative *Ogt* expression normalized to TBP (TATA-box binding protein). **C.**
860 Relative *Oga* expression normalized to TBP. **D.** Western blot analysis of OGT and O-
861 GlcNAcylation levels in liver, muscle, white adipose (WAT), brown adipose (BAT) tissue of
862 OGT^{LWT} and OGT^{LKO} mice. Tubulin was used as loading control. One representative sample is
863 presented per condition. **E.** Liver sections stained with hematoxylin-eosin (HE), Sirius Red,
864 α SMA, Krt7, OGT, SOX9 and TUNEL. Scale bars = 100 μ m. **F.** Relative expression levels of
865 fibrosis markers normalized to TBP. **G.** Serum levels of alanine aminotransferase (ALT),
866 aspartate aminotransferase (AST) and lactate dehydrogenase (LDH). **H.** Relative expression
867 levels of proliferation markers normalized to TBP. **I.** Relative expression levels of
868 inflammatory markers normalized to TBP. **J.** Serum levels of Cxcl1. Data are shown as Mean
869 \pm SEM of 5-10 individual male mice. *P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001 by unpaired Student
870 t-test (Mann-Whitney).

871

872 **Figure 2. OGT^{LKO} mice exhibit liver extensive fibrosis at 8 weeks.**

873 Male liver-specific *Ogt* knockout (OGT^{LKO}) and control floxed littermates (OGT^{LWT}) mice were
874 studied 8 weeks after birth in the fed state. **A.** Fed blood glucose (mmol/L), body weight (g),
875 liver and spleen weights are shown. Liver and spleen weights are represented as percentage of
876 body weight. **B.** Macroscopic view of spleen and liver from OGT^{LWT} (left) and OGT^{LKO} (right)

877 mice. **C.** Macroscopic view of histological liver section stained with Sirius red. **D.** Relative
 878 expression levels of fibrosis markers normalized to TBP. **E.** Expression levels of OGT
 879 normalized to TBP. **F.** Western blots of OGT content and O-GlcNAcylation levels in liver of
 880 OGT^{LWT} and OGT^{LKO} mice at 8 weeks. Three representative samples are shown. Actin was used
 881 for normalization. **G.** Liver sections stained with hematoxylin-eosin (HE), Sirius red, α SMA,
 882 OGT, Ki67 and TUNEL. Scale bars = 100 μ m. **H.** Western blot analysis of necroptosis proteins
 883 (MLKL and RIPK3). Six representative samples are shown. Tubulin was used for normalization
 884 and quantification. **I.** Serum levels of alanine aminotransferase (ALT) and lactate
 885 dehydrogenase (LDH). **J.** Relative expression levels of inflammatory markers normalized to
 886 TBP. **K.** Serum levels of inflammatory cytokines. Data are shown as Mean \pm SEM of 13-15
 887 male mice per condition. *P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001 by unpaired Student t-test (Mann-
 888 Whitney).

889
 890 **Figure 3. Microarray analysis in liver reveals specific transcriptional changes at 4 and 8**
 891 **weeks in OGT^{LKO} mice.** Results were generated using microarray data from 5 replicates per
 892 condition. **A-B.** Volcano plot representing differential gene expression of 22206 genes
 893 comparing livers from OGT^{LKO} and OGT^{LWT} mice 4 (**A**) and 8 (**B**) weeks after birth. Log₂FC
 894 (fold change) is represented in the X-axis and log₁₀FDR (False Discovery Rate) p-value in the
 895 Y-axis. Fold change \geq |2| and FDR p-value < 0.05 were taken as cut-off parameters for selection
 896 of differentially expressed (DE) genes, represented in red. **C.** Venn diagram of DE genes in the
 897 liver of 4 and 8 week-old mice. **D.** Hierarchical clustering showing differential expression of
 898 genes in liver of OGT^{LKO} mice compared to OGT^{LWT}. **E-F.** Top REACTOME pathways
 899 significantly up- or down-regulated using the DE genes between male OGT^{LKO} and OGT^{LWT}
 900 mice at 4 (**E**) or 8 (**F**) weeks.

901

902 **Figure 4. Hepatic OGT deficiency leads to oxidative stress, ER stress, DNA damage and**
903 **enhanced sensitivity to cell death.**

904 Experiments were performed in primary cultured hepatocytes from 4 week-old male and female
905 mice. **A.** Ratio of reduced to oxidized glutathione (GSH/GSSG). **B.** NRF2 activity measured
906 upon transfection with a plasmid containing a 3xARE-luciferase NRF2 reporter gene. **C.**
907 Western blot analysis of OGT, markers of oxidative stress, ER stress and DNA damage
908 markers. Two representative samples are shown. **D.** Total ROS levels measured by CellRox
909 (Ozyme). **E.** Lipid peroxidation analyzed by flow cytometry-based Bodipy 581/591 assays
910 (Molecular Probes). **F.** Western blot analysis of OGT and cleaved caspase-3 after 8h of
911 staurosporine (StS) treatment. Actin was used as a loading control and quantification for 8 hours
912 post StS treatment is shown. **G.** Western blot analysis of OGT and cleaved caspase-3 after 24h
913 of Thapsigargin treatment. Actin was used as a loading control and quantification for cleaved
914 caspase 3 is shown. Data are shown as Mean \pm SEM of two to five independent cultures done
915 in triplicate. *P < 0.05; ***P < 0.001; ****P < 0.0005 by unpaired Student t-test (Mann-
916 Whitney).

917
918 **Figure 5. Oxidative stress, ER stress, lipid peroxidation and DNA damage in liver of 4 and**
919 **8 weeks old OGT^{LKO} mice.**

920 Male liver-specific *Ogt* knockout (OGT^{LKO}) and control floxed littermates (OGT^{LWT}) mice were
921 studied 4 and 8 weeks after birth in the fed state. **A.** Relative expression levels of oxidative
922 stress markers normalized to TBP. **B.** Relative expression of *Chop* normalized to TBP. **C.**
923 Western blots showing protein content in whole liver lysates of markers of oxidative stress (p-
924 p62), ER stress (CHOP) and DNA damage (γ H2A.X) normalized to Actin. Cropped membranes
925 are indicated with discontinued lines. **D.** Quantification of p-p62, CHOP and γ H2A.X is shown.
926 **E.** Malondialdehyde (MDA) staining, in liver sections from 4 and 8 week-old OGT^{LWT} and

927 OGT^{LKO} mice. Scale bars = 100 μ m. **F.** Liver sections from OGT^{LWT} and OGT^{LKO} mice at 12
928 weeks and 12 months of age stained with Sirius red. Scale bars = 100 μ m. Data are shown as
929 Mean \pm SEM of 8-10 mice at 4 weeks, 13-15 mice at 8 weeks, 18-20 mice at 12 weeks and 18-
930 20 mice at 1 year. *P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001 by unpaired Student t-test (Mann-
931 Whitney).

932

933 **Figure 6. Low carbohydrate high fat (LCHF) diet improves oxidative stress, ER stress**
934 **and DNA damage but not fibrosis in OGT^{LKO} mice.**

935 Liver-specific *Ogt* knockout (OGT^{LKO}) and control floxed littermates (OGT^{LWT}) mice (males
936 and females) were weaned (at 3 weeks of age) on a low carbohydrate high fat (LCHF) diet and
937 sacrificed 5 weeks later in the fed state. **A.** Relative expression levels of oxidative stress markers
938 normalized to TBP. **B.** Western blot analysis of CHOP protein content in liver of OGT^{LWT} and
939 OGT^{LKO} mice either on SD or LCHF diet. Four representative samples are shown. **C.** Western
940 blot analysis of γ H2AX protein content in liver of OGT^{LWT} and OGT^{LKO} mice either on SD or
941 LCHF diet. Three representative samples are shown. **D.** Quantification of CHOP and γ H2AX
942 is shown. Actin was used as a loading control. **E.** Liver sections stained with hematoxylin-
943 eosin (HE), F4/80, Sox9, Krt7, Sirius red and OGT. Scale bars = 50 μ m. **F.** Quantification of
944 fibrosis by second Harmonic Generation microscopy (SHG). **G.** Relative expression levels of
945 fibrosis markers normalized to TBP. **H.** Relative expression levels of inflammatory markers
946 normalized to TBP. **I.** Serum levels of alanine aminotransferase (ALT) and alkaline
947 phosphatase (ALP). Data are shown as Mean \pm SEM of 4-13 mice (males and females). *P <
948 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001; ****P < 0.0005 by unpaired Student t-test (Mann-Whitney).

949

950 **Figure 7. Ketogenic diet (KD) improves oxidative stress, ER stress, DNA damage, hepatic**
951 **fibrosis and liver injury in OGT^{LKO} mice**

952 Liver-specific *Ogt* knockout (OGT^{LKO}) and control floxed littermates (OGT^{LWT}) mice (males
953 and females) were weaned (at 3 weeks of age) on ketogenic diet (KD) diet and sacrificed 5
954 weeks later in the fed state. **A.** Relative expression levels of oxidative stress markers normalized
955 to TBP. **B.** The proportion of highly polyploid ($\geq 8n$) mononuclear hepatocytes relative to total
956 hepatocytes was quantified in each group. Blue: plasma membrane labeling (KL1). Red:
957 nuclear labelling (Hoechst) (scale bar=100 μ m). **C.** Western blot analysis of CHOP protein
958 content in livers of OGT^{LWT} and OGT^{LKO} mice. Three to four representative samples are shown.
959 **D.** Western blot analysis of γ H2AX protein content in livers of OGT^{LWT} and OGT^{LKO} mice.
960 Three to four representative samples are shown. **E.** Quantification of CHOP and γ HA2X are
961 shown. Actin was used as a loading control. **F.** Liver sections stained with hematoxylin-eosin
962 (HE), F4/80, Sox9, Krt7, Sirius red and OGT. Scale bars = 100 μ m. **G.** Quantification of fibrosis
963 by second Harmonic Generation microscopy (SHG). **H.** Relative expression levels of fibrotic
964 markers normalized to TBP. **I.** Relative expression levels of inflammatory markers normalized
965 to TBP. **J.** Serum levels of alanine aminotransferase (ALT) and alkaline phosphatase (ALP).
966 Data are shown as Mean \pm SEM of 4-8 mice (males and females). *P < 0.05; **P < 0.01; ***P
967 < 0.001; ****P < 0.0005 by unpaired Student t-test (Mann-Whitney).
968

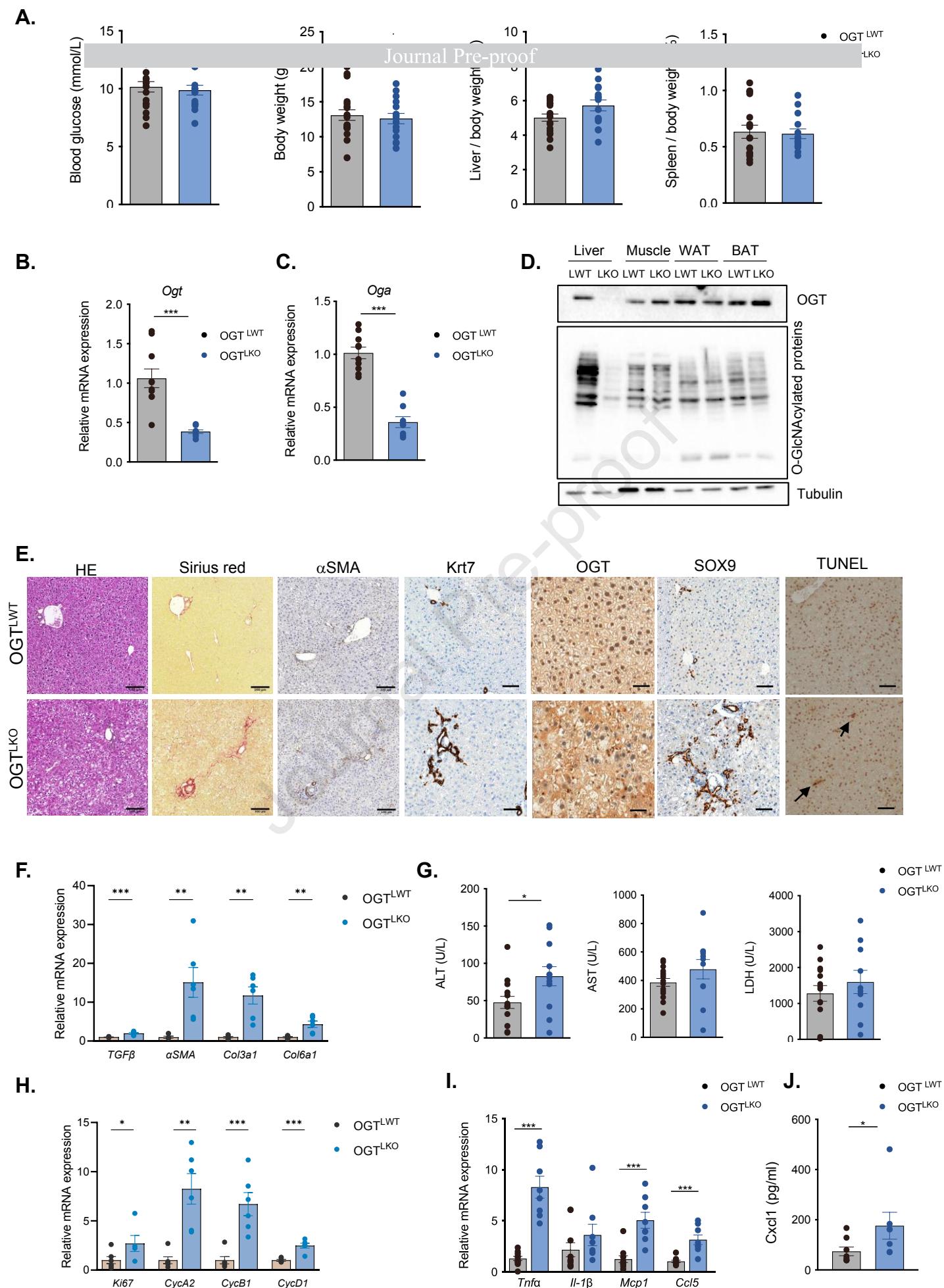


Figure 1

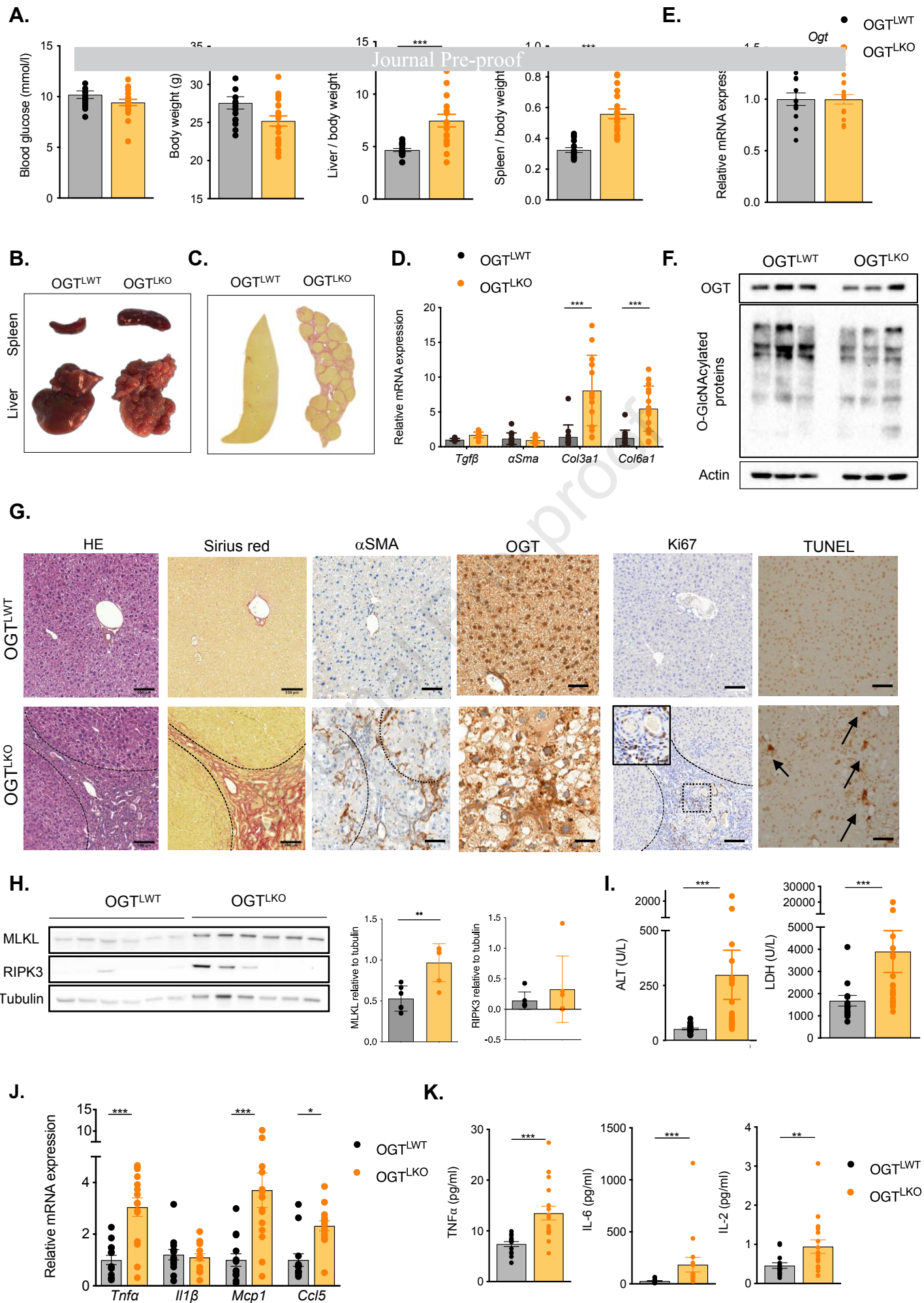
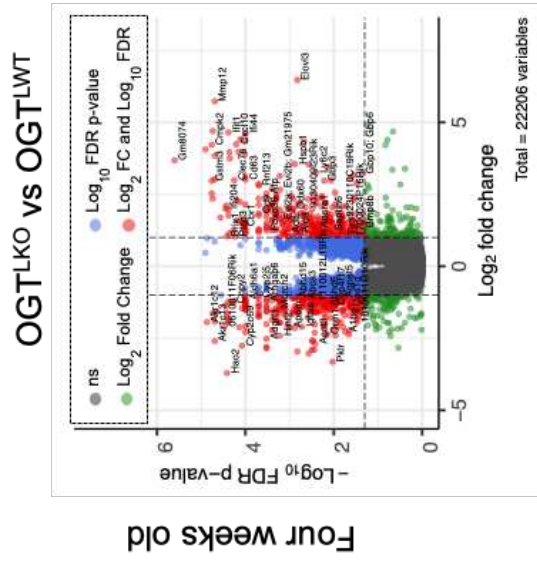
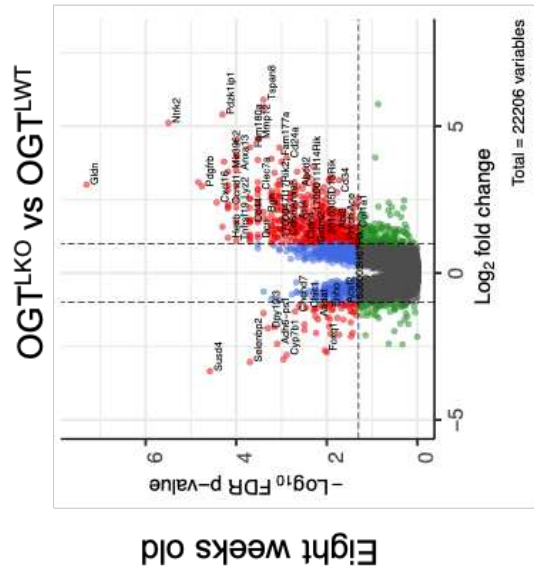
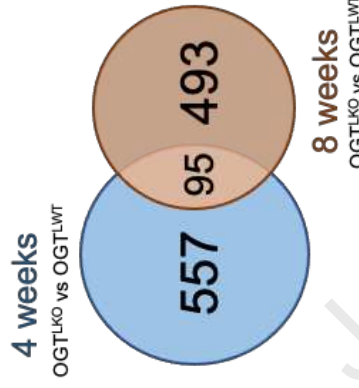
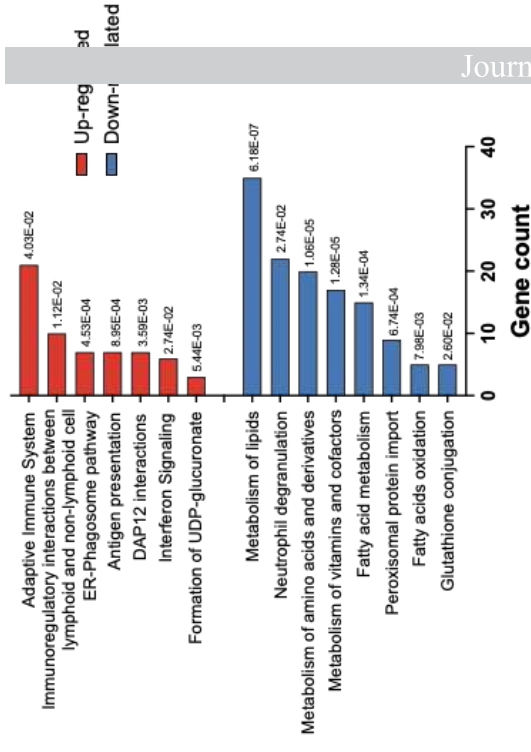


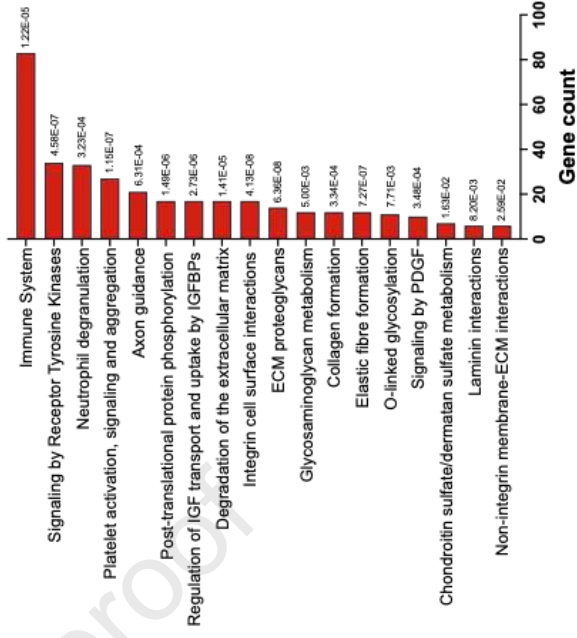
Figure 2

A.**B.****C.****E.****REACTOME pathways**

OGTLKO vs OGTLWT

**F.****REACTOME pathways**

OGTLKO vs OGTLWT



LWT LKO LWT LKO

Figure 3

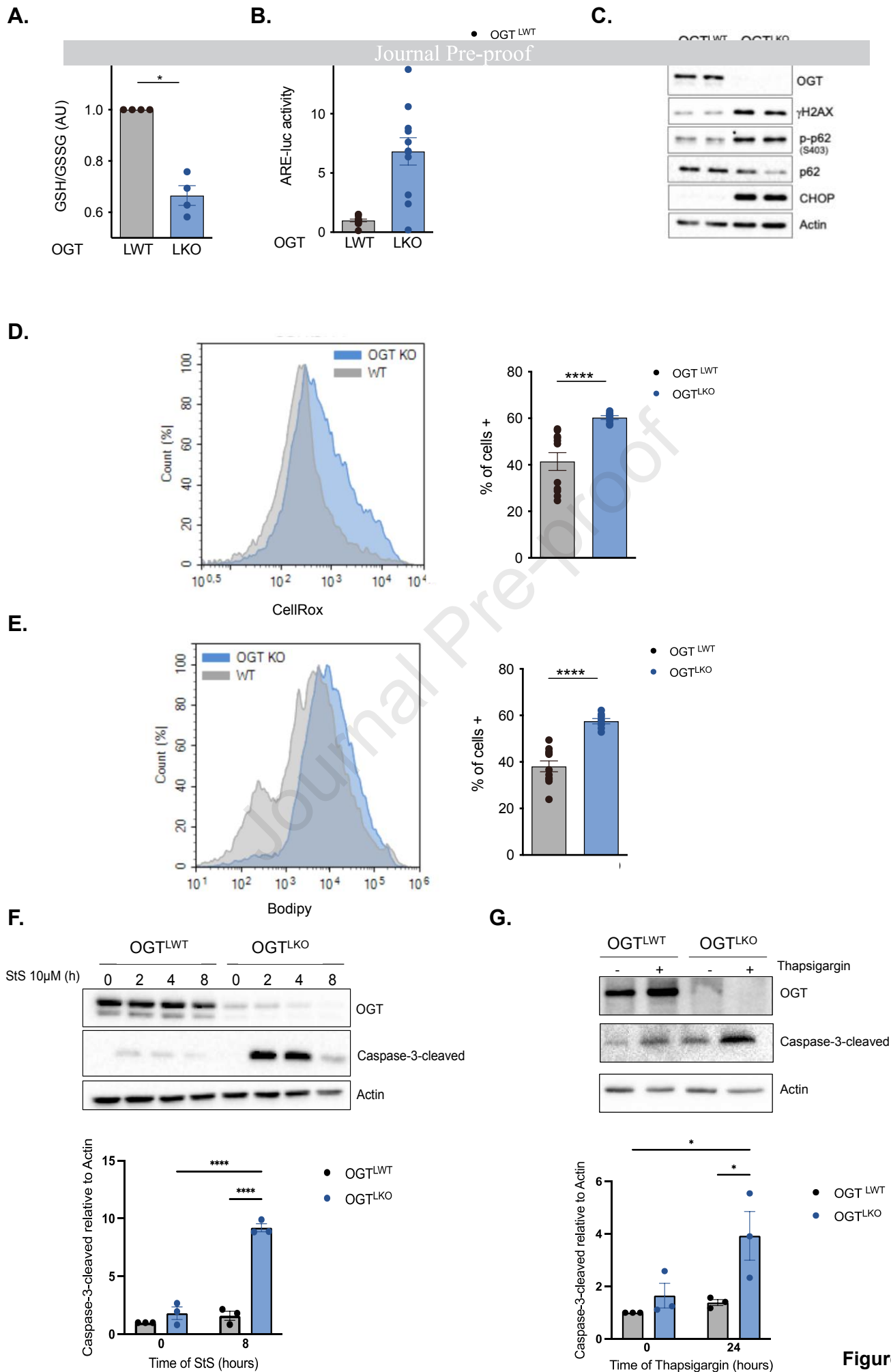


Figure 4

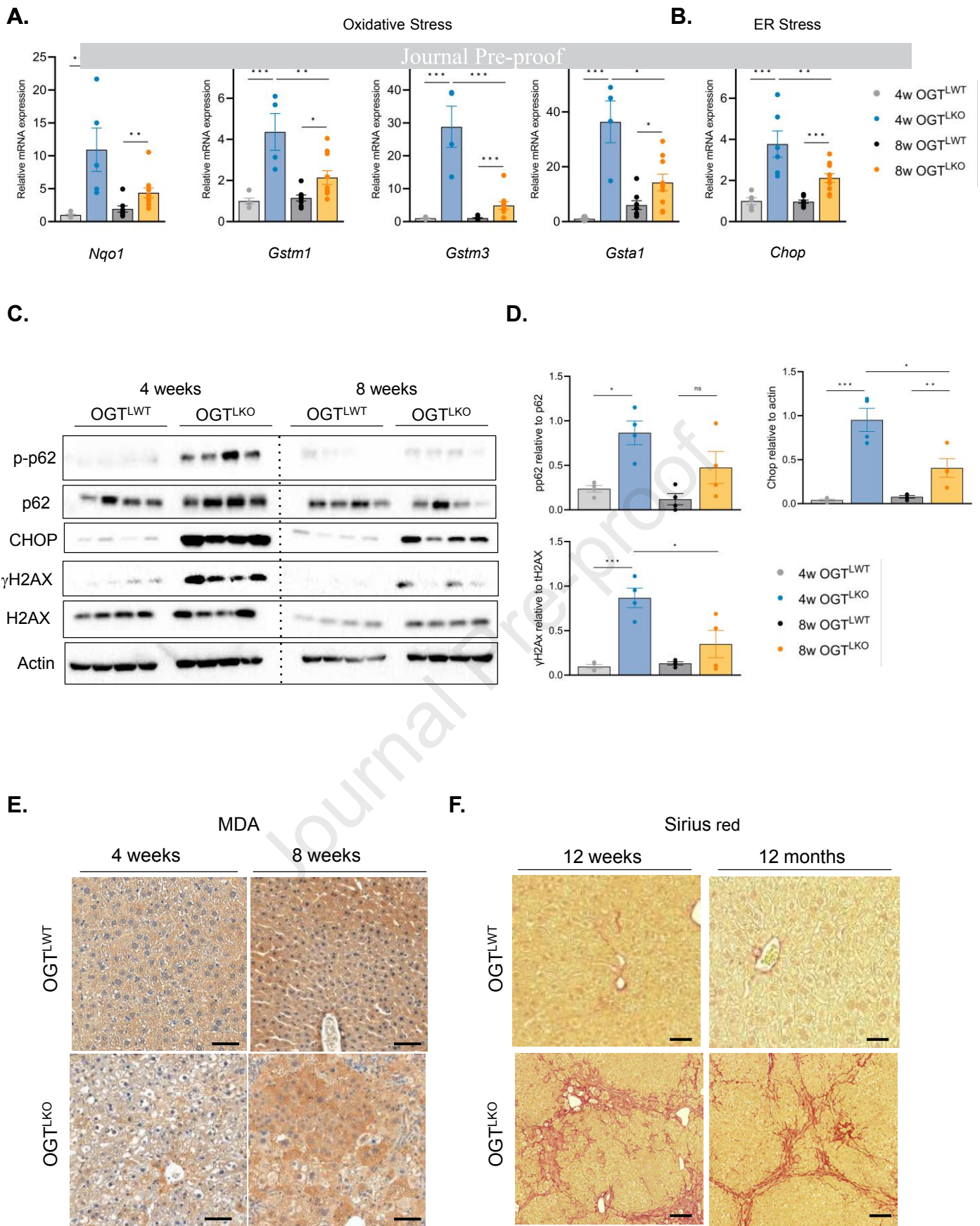


Figure 5

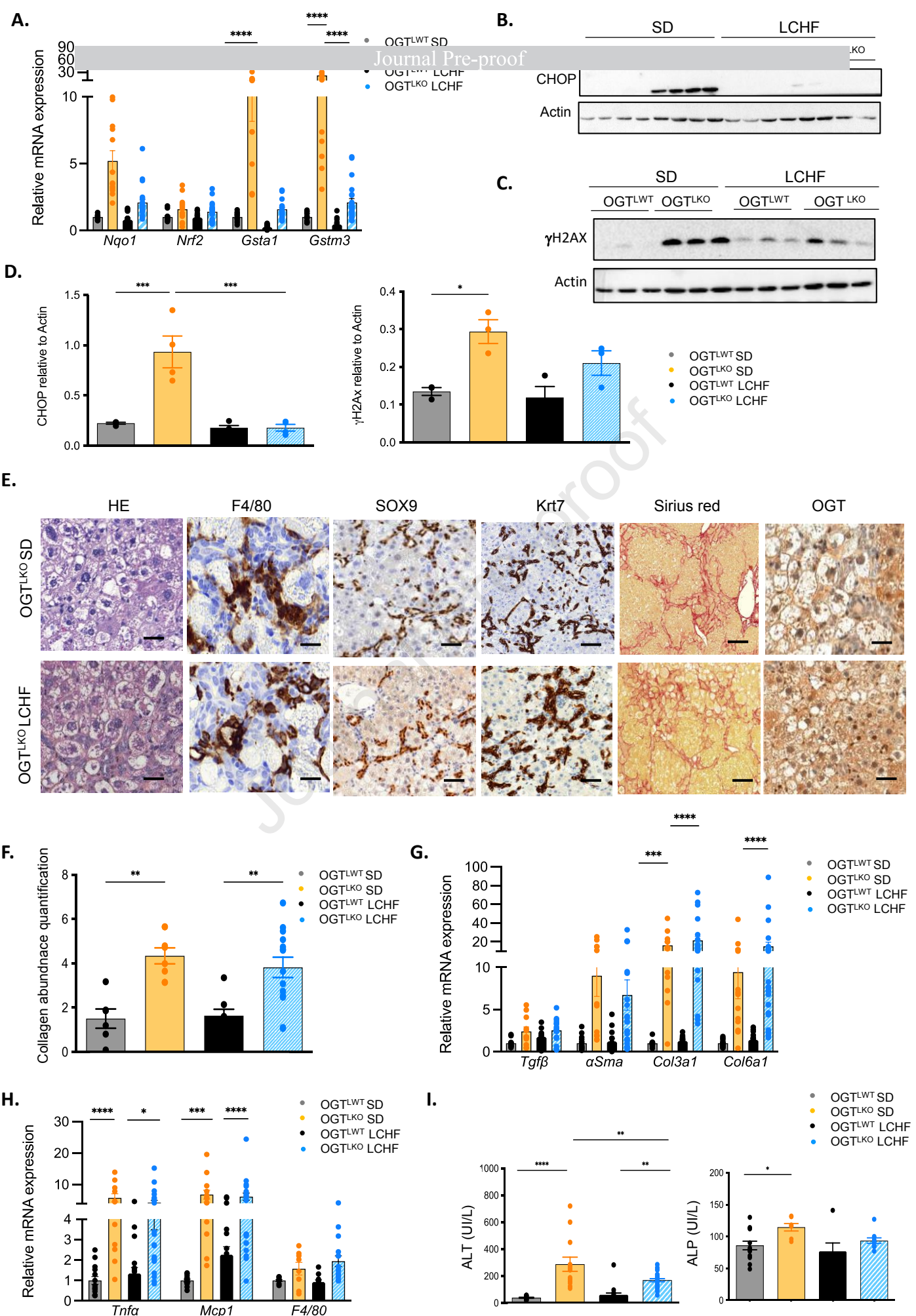


Figure 6

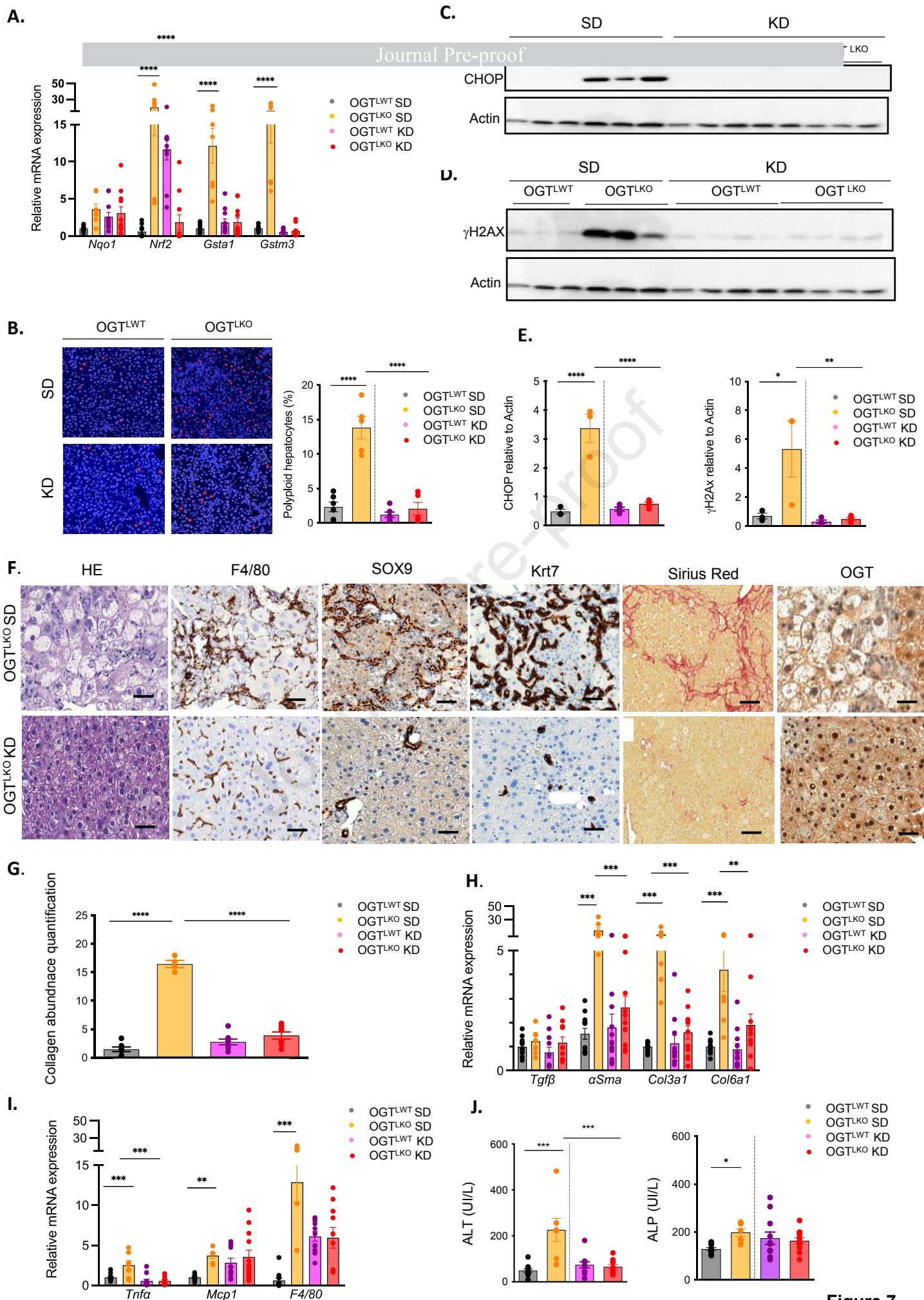


Figure 7

- O-GlcNAcylation is a reversible post-translational modification controlled by the activity of two enzymes, O-GlcNAc transferase (OGT) and O-GlcNAcase (OGA).
- In liver, O-GlcNAcylation has emerged as an important regulatory mechanism underlying normal liver physiology and metabolic disease
- We report that OGT deficiency is associated with hepatic oxidative stress, DNA damage, together with liver inflammation and advanced fibrosis.
- Interestingly, a nutritional switch at weaning (lowering carbohydrate intake) fully prevented the hepatic alteration caused by OGT deficiency
- Our study reveals that OGT act as an important nutritional sensor in liver

1 **O-GlcNAc transferase acts as a critical nutritional node for the control of liver**
2 **homeostasis**

3 Paula Ortega-Prieto^{1*}, Lucia Parlati^{1*}, Fadila Benhamed¹, Marion Regnier¹, Isadora
4 Cavalcante², Mélanie Montabord¹, Rachel Onifarasoaniaina³, Maryline Favier³, Natasa
5 Pavlovic⁴, Julie Magusto⁵, Michèle Cauzac¹, Patrick Pagesy¹, Jérémie Gautheron⁵, Chantal
6 Desdouets⁴, Sandra Guilmeau¹, Tarik Issad^{1#} and Catherine Postic^{1#}

7 ¹Université Paris Cité, Institut Cochin, CNRS, INSERM, Paris, France; ² Team Genomics and
8 signaling of endocrine tumors, Institut Cochin, CNRS, INSERM, Université Paris Cité, F-
9 75014 PARIS, France ; ³HistIM Platform, Institut Cochin, CNRS, INSERM, Université de
10 Paris Cité, F- 75014 PARIS, France; ⁴Team Proliferation, Stress and liver physiopathology,
11 Centre de Recherche des Cordeliers, INSERM, Sorbonne Université, Université Paris Cité, F-
12 75006 PARIS, France; ⁵Centre de Recherche Saint-Antoine, Sorbonne Université, Inserm,
13 Paris, France.

19 **Legends of supplementary Figures**

20

21 **Figure S1. Physiological parameters in 4 week-old OGT^{LWT} and OGT^{LKO} mice.** Male liver-
22 specific *Ogt* knockout (OGT^{LKO}) and control floxed littermates (OGT^{LWT}) mice were studied 4
23 weeks after birth. **A.** Fasting blood glucose (5 hours) (mmol/L). **B.** Glucose tolerance test. The
24 area under the curve (AUC) is shown. **C.** Pyruvate tolerance test. The area under the curve
25 (AUC) is shown. **D.** Insulin tolerance test. The area under the curve (AUC) is shown. **E.**
26 Western blot analysis of Foxo1 (whole lysate), Foxo1O-GlcNAcylation levels (WGA) and
27 global O-GlcNAcylation in liver of OGT^{LWT} and OGT^{LKO} mice. Actin was used as loading
28 control. Three representative samples are presented per condition. **F.** Relative expression levels
29 of gluconeogenic genes normalized to TBP. Data are shown as Mean \pm SEM of 6-8 male mice.
30 *P < 0.05; **P < 0.01; ***P<0.001 by unpaired Student t-test (Mann-Whitney).

31

32 **Figure S2. Liver injury and cell identity assessment in OGT^{LKO} mice.** Male liver-specific
33 *Ogt* knockout (OGT^{LKO}) and control floxed littermates (OGT^{LWT}) mice were studied 8 weeks
34 after birth in the fed state. **A.** Relative expression of *Oga* normalized to TBP **B.** Relative
35 expression levels of proliferation markers normalized to TBP. **C.** Western blot analysis of
36 proliferation markers. Three representative samples are shown. Actin was used as a loading
37 control. **D.** Liver section of mice without macroscopic nodular phenotype stained with HE,
38 Sirius red and OGT. **E.** Serum levels of aspartate aminotransferase (AST), total and direct
39 bilirubin and alkaline phosphatase (ALP) in mice 8 weeks after birth. **F.** Representation of
40 hepatoblast differentiation into hepatocytes or cholangiocytes. Markers used for cell
41 characterization are represented under each cellular type. **G.** Relative expression of cell identity
42 markers in livers from OGT^{LWT} compared to OGT^{LKO} mice at 4 and 8 weeks. TBP was used as
43 a housekeeping gene. **H.** Liver sections of 8 week-old mice stained with HNF4 α , SOX9 and

44 Krt19 antibodies. Scale bars = 100 μ m on the two upper sections. Detailed zoom is shown in
45 the bottom sections with a scale bar = 50 μ m. PV: Portal vein. CV: Central vein. Data are
46 represented as Mean \pm SEM of 8-10 mice at 4 weeks and 13-15 mice at 8 weeks. **P < 0.01;
47 ***P < 0.001 by unpaired Student t-test (Mann-Whitney) comparing OGT^{LWT} and OGT^{LKO} at
48 the same age.

49

50 **Figure S3. Female OGT^{LKO} mice exhibit severe liver damage.**

51 Female liver-specific *Ogt* knockout (OGT^{LKO}) and control floxed littermates (OGT^{LWT}) mice
52 were studied 8 weeks after birth in the fed state. **A.** Fed blood glucose (mmol/L), body (g), liver
53 and spleen weights are shown. Liver and spleen weight are represented as percentage of body
54 weight. **B.** Relative expression levels of *Ogt* normalized to TBP. **C.** Western blot analysis of
55 OGT and CHOP protein content in liver of OGT^{LWT} and OGT^{LKO} mice. Four representative
56 samples are shown. Actin was used as a loading control. **D.** Liver sections stained with
57 hematoxylin-eosin (HE), Sirius red, α SMA, OGT, Ki67 and SOX9. Scale bars = 100 μ m. **E.**
58 Relative expression levels of inflammatory markers normalized to TBP. **F.** Relative expression
59 levels of fibrosis markers normalized to TBP. **G.** Relative expression levels of oxidative stress
60 markers normalized to TBP. **H.** Serum levels of alanine aminotransferase (ALT). Data are
61 shown as Mean \pm SEM of 5 female mice per condition. *P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001;
62 ****P < 0.0005 by unpaired Student t-test (Mann-Whitney).

63

64 **Figure S4. Heatmaps of oxidative stress, necroptosis, DNA repair and extracellular matrix.**

65 **A.** Microarray results of genes involved in oxidative stress. **B.** Microarray results of genes
66 involved in necroptosis. **C.** Microarray results of genes involved in DNA repair. **D.** Microarray
67 results of significant changing genes involved in extracellular matrix formation. Genes found
68 significantly different (either down or up-regulated) between OGT^{LWT} and OGT^{LKO} are

69 indicated by an asterisk (*). Differentially expressed (DE) gene cut-off was set for a fold change
70 $\geq |2|$ and False discovery rate (FDR) p-value < 0.05 .

71

72 **Figure S5. Kinetics of inflammation, oxidative stress and ER stress markers in liver of**
73 **OGT^{LWT} and OGT^{LKO} mice.** Male liver-specific *Ogt* knockout (OGT^{LKO}) and control floxed
74 littermates (OGT^{LWT}) mice were studied 2, 4 or 8 weeks after birth in the fed state. **A.** Western
75 blots showing protein content in whole liver lysates of inflammation (Phospho-JNK and total
76 JNK), ER stress (CHOP) markers. Actin and/or HSP90 were used as loading controls. **B.**
77 Relative expression levels of oxidative stress markers and of *Chop* normalized to TBP. Data
78 are represented as Mean \pm SEM of 6 mice per group age. *P < 0.05 ; ***P < 0.001 ; ****P $<$
79 0.0005 by unpaired Student t-test (Mann-Whitney).

80

81 **Figure S6. Persistent fibrosis and liver injury in 12 weeks and 12 months old OGT^{LKO}**
82 **mice.** Liver-specific *Ogt* knockout (OGT^{LKO}) and control floxed littermates (OGT^{LWT}) mice
83 were studied 12 weeks and 12 months after birth in the fed state. **A.** Liver and spleen weights
84 are shown and are represented as percentage of body weight. **B.** Relative expression levels of
85 oxidative stress and inflammatory markers normalized to TBP. **C.** Liver sections stained with
86 hematoxylin-eosin (HE) and F4/80. Scale bars = 100 μm . **D.** Serum levels of alanine
87 aminotransferase (ALT) of alkaline phosphatase (ALP) and lactate dehydrogenase (LDH). Data
88 are shown as Mean \pm SEM of 18-20 individual male and female mice at 12 weeks and 12
89 months. *P < 0.05 ; **P < 0.01 ; ***P < 0.001 and ****P < 0.0005 by unpaired Student t-test
90 (Mann-Whitney).

91

92 **Figure S7. Low carbohydrate high fat (LCHF) diet improves oxidative stress, ER stress**
93 **and DNA damage but not fibrosis in OGT^{LKO} mice.** **A.** Liver-specific *Ogt* knockout

94 (OGT^{LKO}) and control floxed littermates (OGT^{LWT}) mice were weaned (at 3 weeks of age) on a
95 low carbohydrate high fat (LCHF in % of calories: 21% of carbohydrates, 60% of fat, 19% of
96 proteins) diet and sacrificed 5 weeks later in the fed state. **B.** Body weight (g), liver and spleen
97 weights are shown. Liver and spleen weights are represented as percentage of body weight. **C.**
98 Serum concentrations of β -hydroxybutyrate. **D.** Relative expression levels of *Chop* normalized
99 to TBP. **E.** Serum levels of Cxcl1. Data are shown as Mean \pm SEM of 4-12 mice (males and
100 females). *P < 0.05; ***P < 0.001; ****P < 0.0005 by unpaired Student t-test (Mann-Whitney).

101

102 **Figure S8. Ketogenic diet (KD) improves oxidative stress, ER stress, DNA damage,**
103 **hepatic fibrosis and liver injury in OGT^{LKO} mice.** **A.** Liver-specific *Ogt* knockout (OGT^{LKO})
104 and control floxed littermates (OGT^{LWT}) were weaned (at 3 weeks of age) on a ketogenic diet
105 (KD: 1% of carbohydrates, 94% of fat, 5% of protein) and sacrificed 5 weeks later in the fed
106 state. **B.** Body weight (g), liver and spleen weights are shown. Liver and spleen weights are
107 represented as percentage of body weight. **C.** Serum concentrations of β -hydroxybutyrate. **D.**
108 Relative expression levels of *Chop* normalized to TBP. Data are shown as Mean \pm SEM of 4-8
109 mice (males and females). ***P < 0.001; ****P < 0.0005 by unpaired Student t-test (Mann-
110 Whitney).

111

112 **Figure S9. Lipidomic analysis in liver of OGT^{LWT} and OGT^{LKO} mice fed on SD, LCHF or**
113 **KD diets.** **A.** Heat map of lipid species in liver from OGT^{LWT} and OGT^{LKO} mice fed at weaning
114 for 5 weeks with a LCHF diet. Specific clusters are indicated. **B.** Heat map of lipid species in
115 liver from OGT^{LWT} and OGT^{LKO} fed for 5 weeks at weaning with a KD diet. Specific clusters
116 are indicated. Data are shown as Mean \pm SEM of 4-12 mice (males and females).

117

118

119 **List of Supplementary Tables**

120 **Table S1. Differentially expressed genes at 4 weeks**

121 **Table S2. Differentially expressed genes at 8 weeks**

122 **Table S3. Differentially expressed genes common to 4 and 8 weeks**

123 **Table S4. List of primers used for qPCR**

124

125

126

127

128

129

130

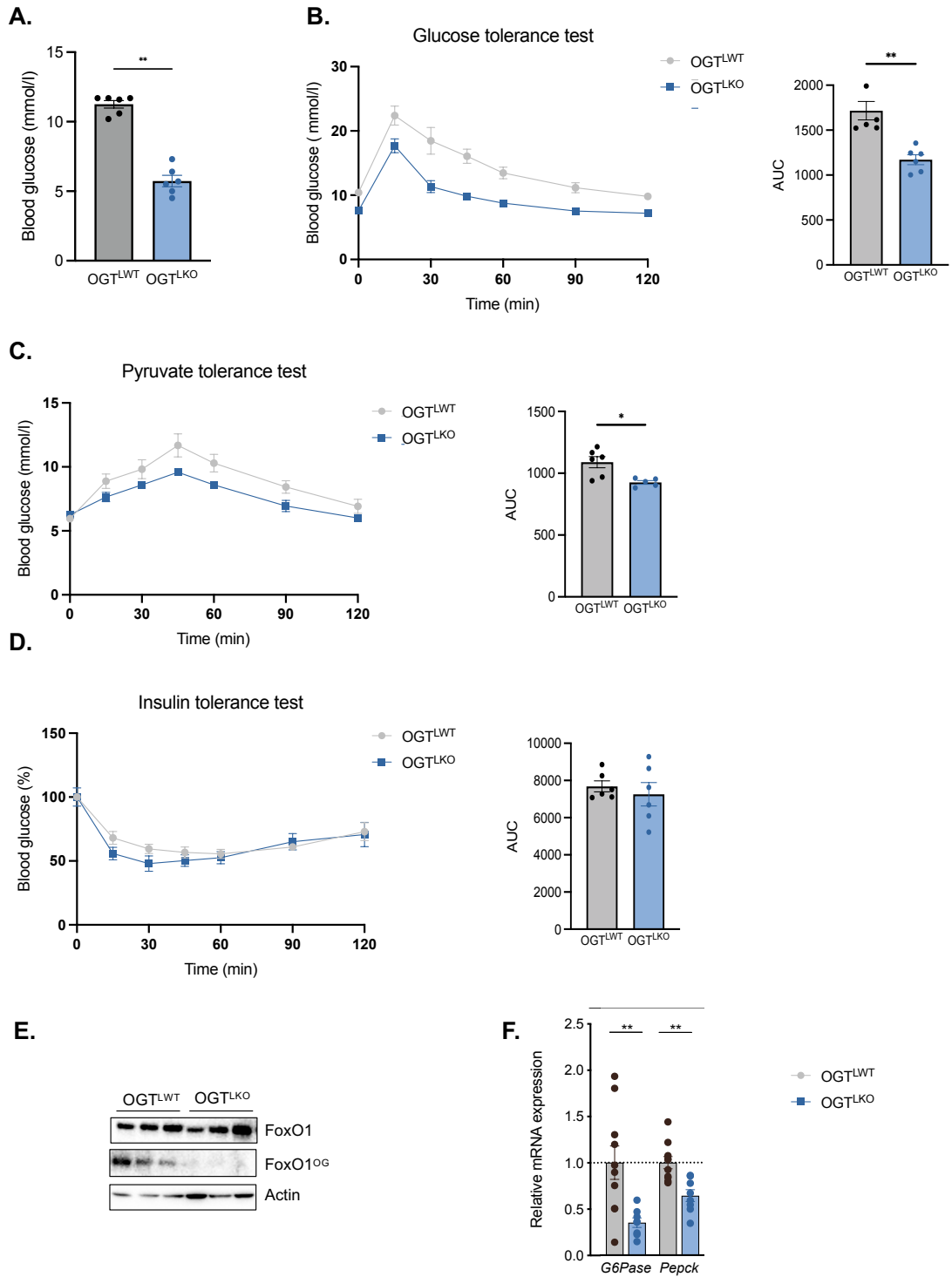


Figure S1

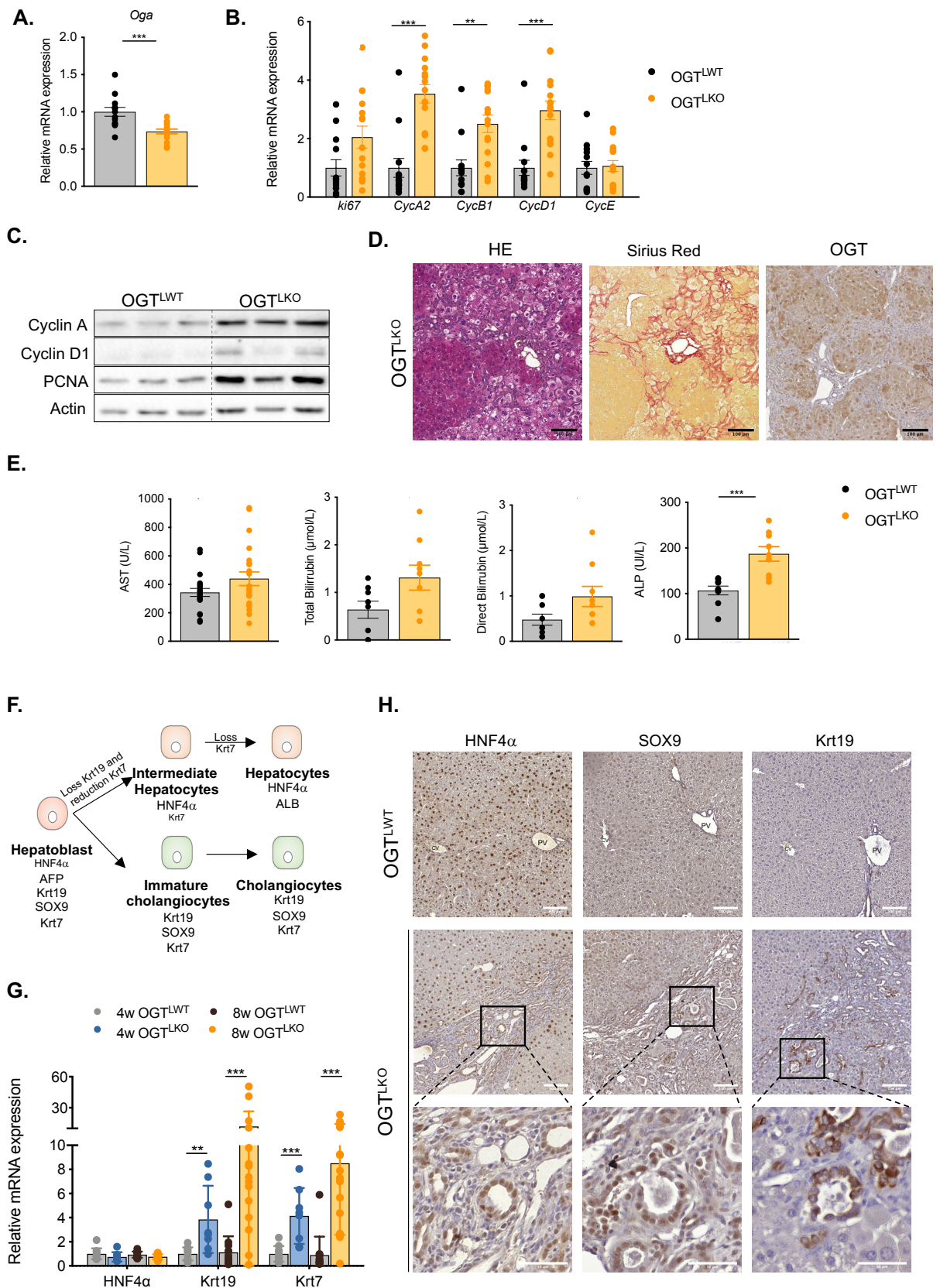


Figure S2

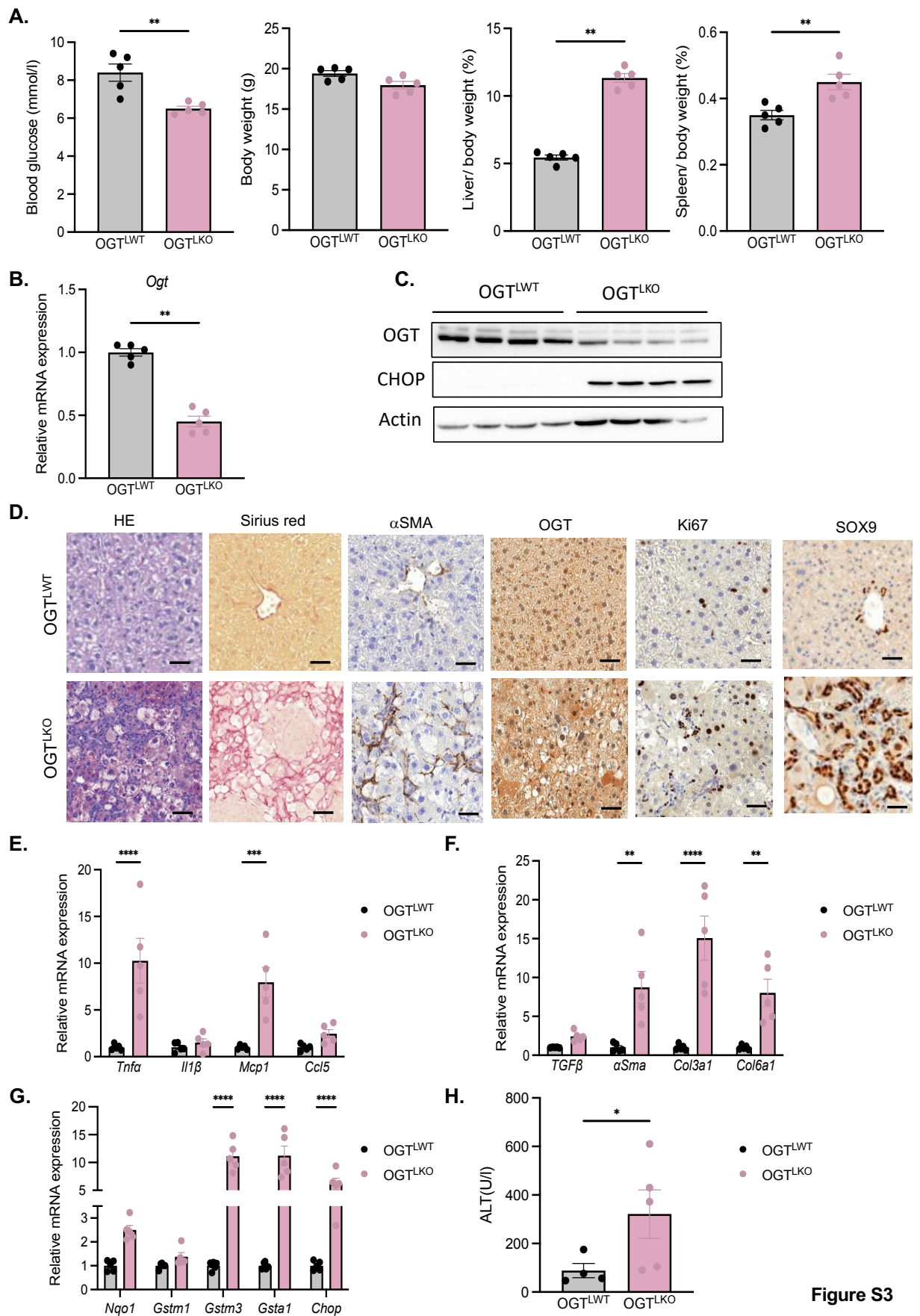
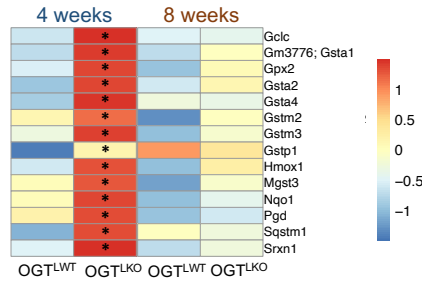
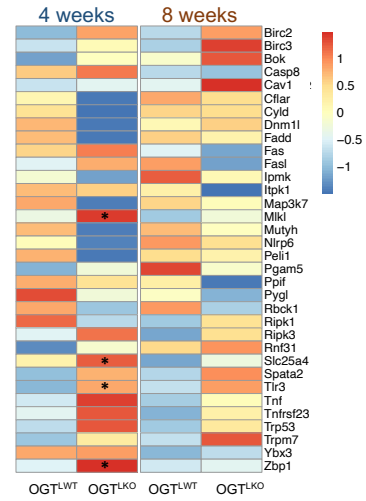


Figure S3

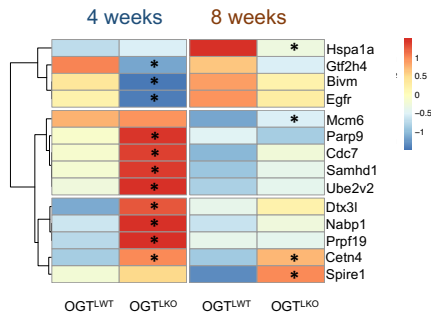
A. Oxidative stress



B. Necroptosis



C. DNA repair



D. Extracellular matrix

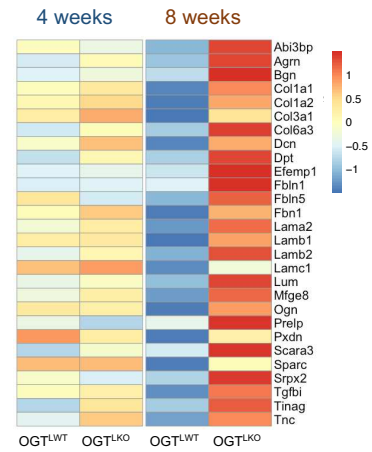
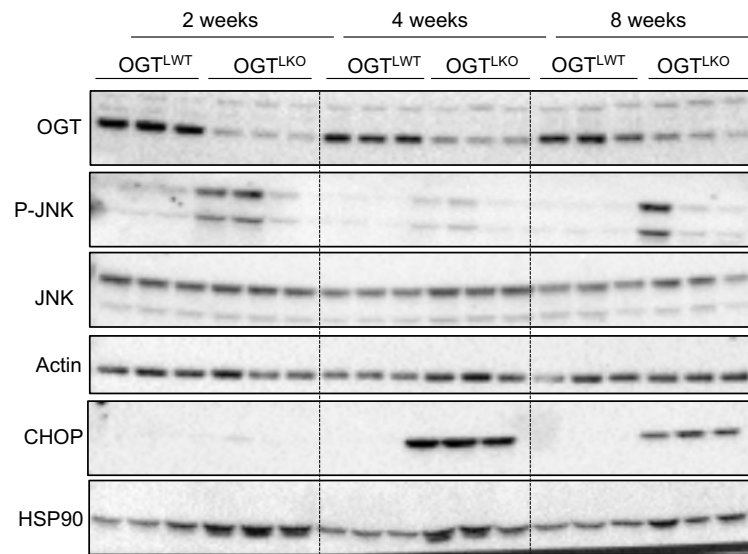


Figure S4

A.



B.

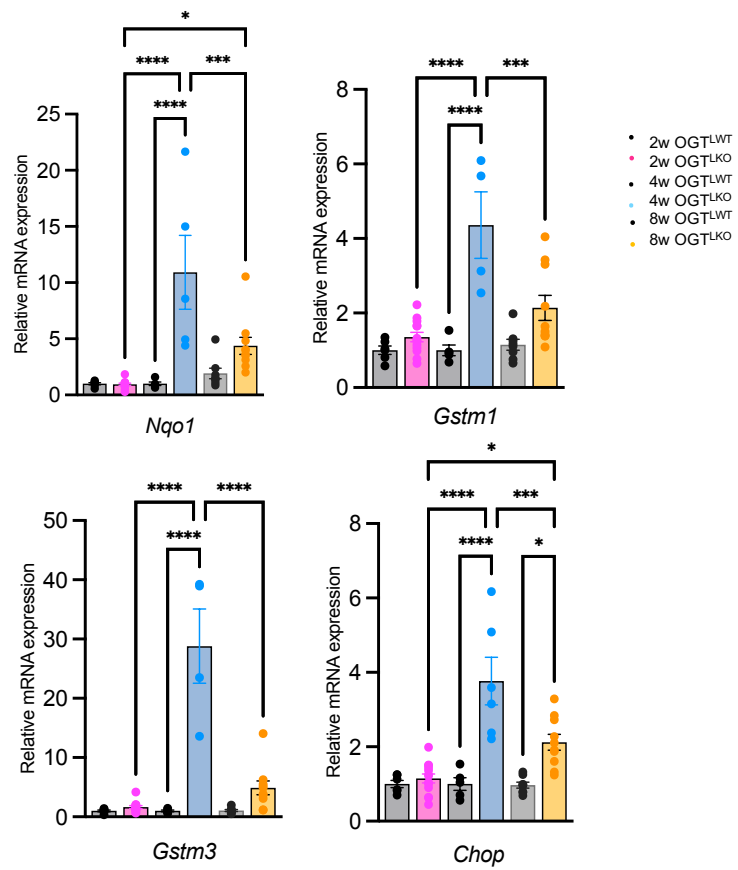


Figure S5

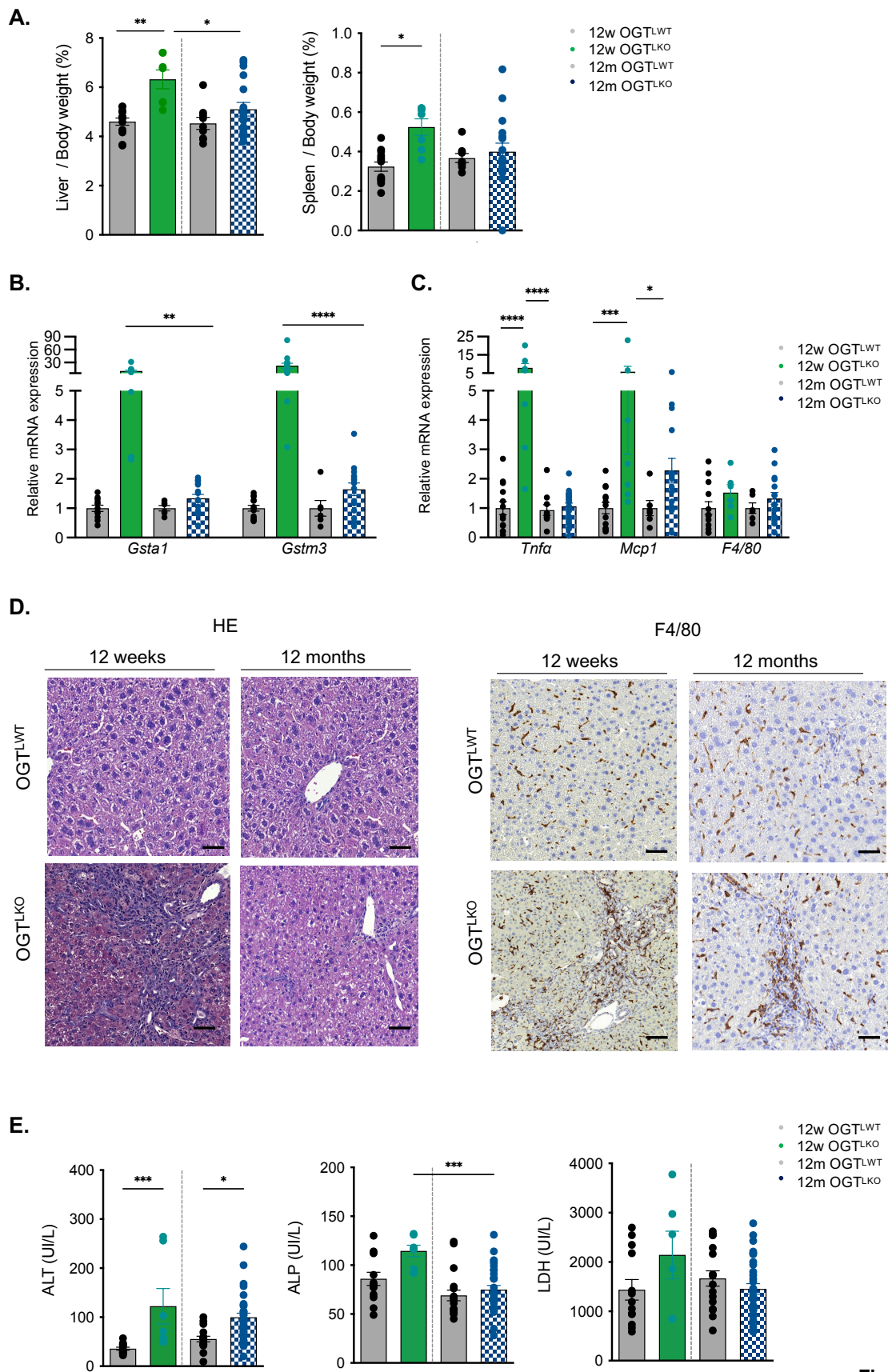


Figure S6

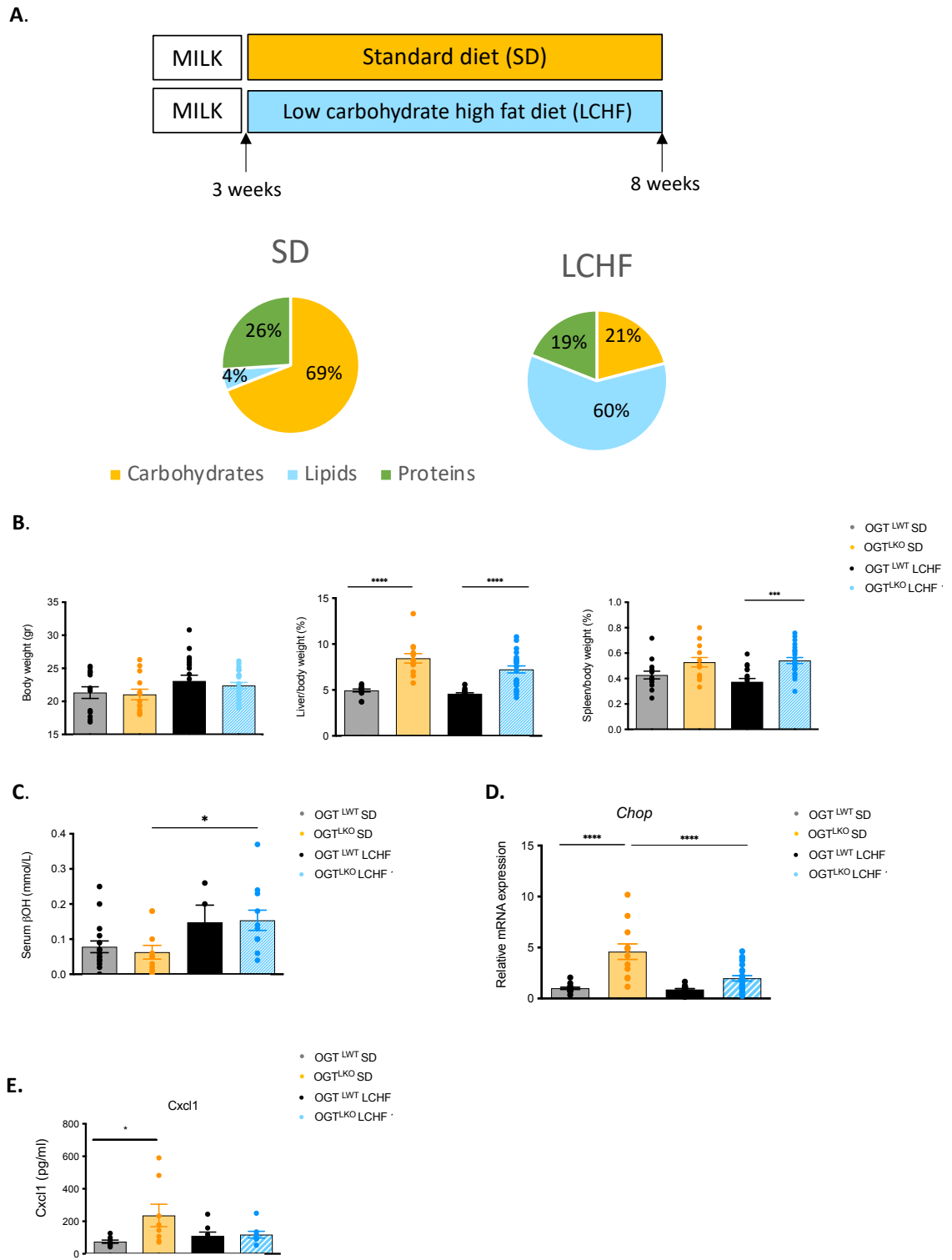
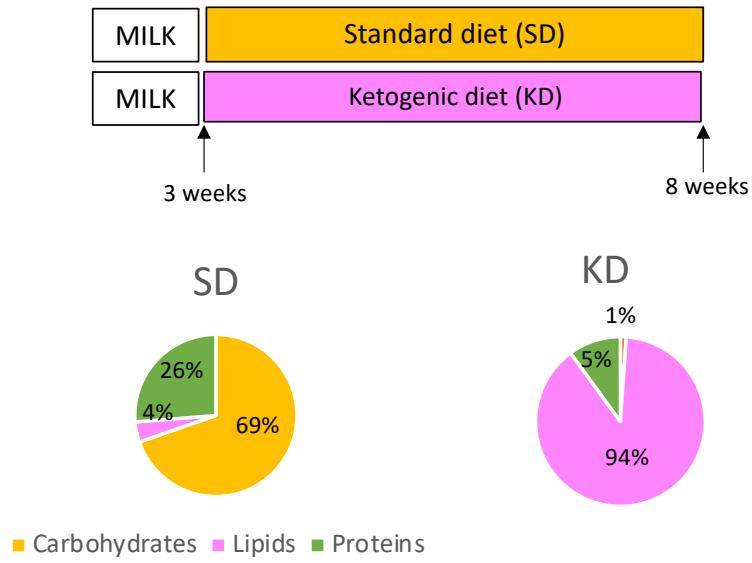
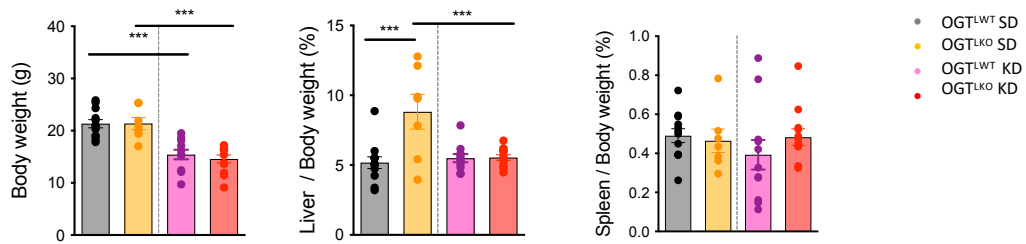


Figure S7

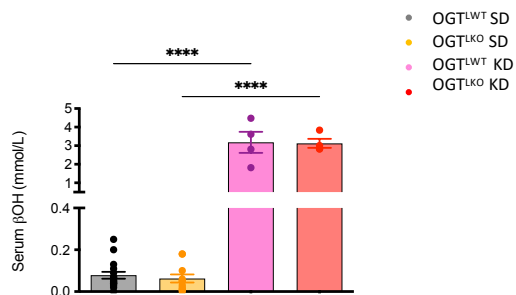
A.



B.



C.



D.

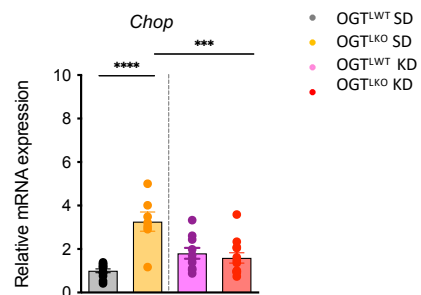
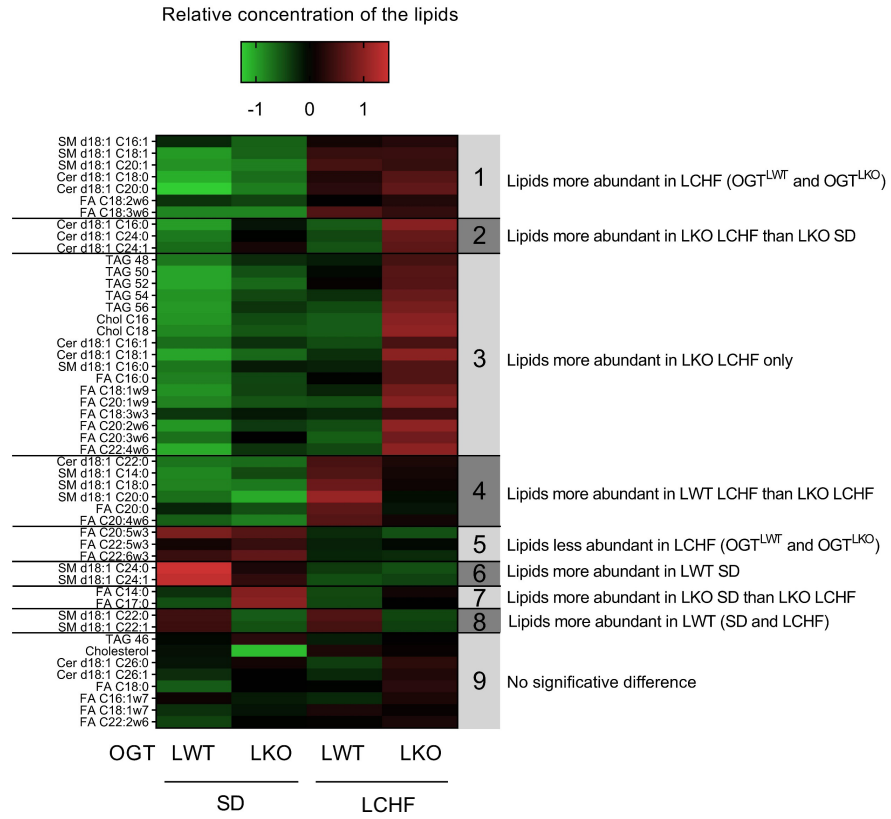


Figure S8

A.



B.

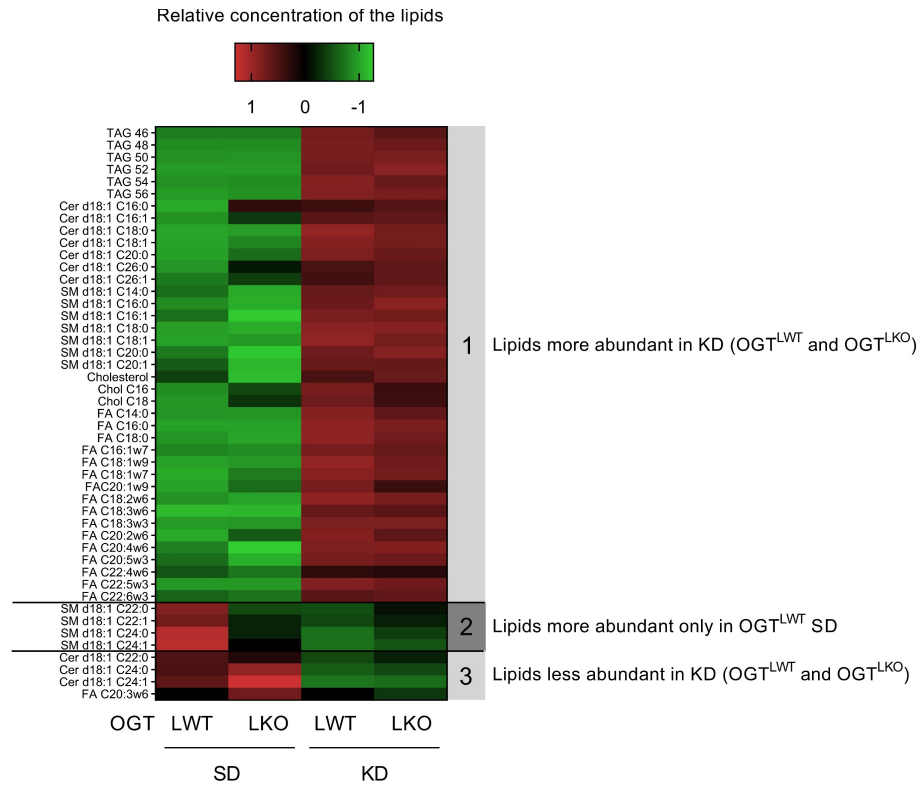


Figure S9

TABLE S1. DE genes at 4 weeks

| | | | |
|---------------|----------------|-------------------|-------------------|
| 0610010F05Rik | C6 | Dhx38 | Gcdh |
| 0610011F06Rik | Calml4 | Dhx58 | Gclc |
| 1110012L19Rik | Car5a | Dixdc1 | Gcsh |
| 1700001C19Rik | Car5b | Dlg3 | Gde1 |
| 1700024P16Rik | Cbr1 | Dnaic1 | Gdpd1 |
| 1810011O10Rik | Cbr3 | Dnajc2 | Gipc2 |
| 2010003K11Rik | Ccbl1 | Dnajc4 | Gm10639 |
| 9130409I23Rik | Ccdc120 | Dnpep | Gm10768; Abcc2 |
| A1bg | Ccl19 | Dnttip2 | Gm11437 |
| Abca3 | Ccl2 | Dpm3 | Gm13139; Znf41-ps |
| Abcb8 | Ccrl2 | Dpyd | Gm13248 |
| Abhd14b | Cd200r1 | Dtx3l | Gm13251 |
| Abhd15 | Cd5l | Dusp10 | Gm18853 |
| Abhd6 | Cdc7 | Dynll1 | Gm1966 |
| Acad12 | Cdk11b | Ear12; Ear2; Ear3 | Gm2a |
| Acot1 | Cdkl5 | Echdc1 | Gm3776; Gsta1 |
| Acot3 | Cenpp | Eda2r | Gm4794 |
| Acot4 | Ces1d | Eif2ak2 | Gm4952 |
| Acs1l | Ces1e | Eif2d | Gm4955 |
| Acss2 | Ces1f | Eif6 | Gm7120 |
| Adar | Ces3b | Elovl3 | Gm8074 |
| Adgrf1 | Cidec | Elp4 | Gpi1 |
| Adra1b | Cisd1 | Emc10 | Gpr155 |
| Afm | Cldn12 | Enox2 | Gpr35 |
| Afp | Clec2d | Enpep | Gpt |
| Agpat5 | Clpb | Entpd5 | Gpx2 |
| Al464131 | Cmb1 | Epas1 | Grb7 |
| Aida | Cmpk2 | Epb41l4b | Grem2 |
| Akr1c12 | Cmtm6 | Ephx1 | Gsta2 |
| Akr1c13 | Cnm2 | Epsti1 | Gsta4 |
| Akr1c19 | Cnpy2 | Etfdh | Gstk1 |
| Aldh6a1 | Coa3 | F11 | Gsto1 |
| Aph1c | Cops7b | Fabp5 | Gstp1 |
| Apol9a | Cox19 | Fam131c | Gstp2 |
| Apol9b | Crip2 | Fam20a | Gstt1 |
| Apom | Cryz | Fam210b | Gstt3 |
| Apon | Cxcl10 | Fam60a | Gtf2h4 |
| Arhgap6 | Cxcl9 | Fam98a | Gtf2ird2 |
| Arrdc4 | Cyp2a22 | Fastkd2 | Guf1 |
| Aspdh | Cyp2a5; Cyp2a4 | Fbxo36 | Gvin1 |
| Aspg | Cyp2c40 | Fbxo4 | Gzmd; Gzme |
| Asrgl1 | Cyp2c69 | Fcgrt | H2-Ke6 |

| | | | |
|----------|------------|-------------|---------------|
| Atat1 | Cyp2d37-ps | Fetub | H2-L; H2-D1 |
| Atf3 | Cyp2f2 | Fgf21 | H2-Q1 |
| Atp2b2 | Cyp2j5 | Fgfr4 | H2-Q4 |
| Atp5e | Cyp2u1 | Fhit | H2-Q5 |
| Atp6v1d | Cyp4a31 | Foxo1 | H2-Q7; H2-Q9 |
| B4galnt1 | Cyp4a32 | Foxp1 | H2-Q8; H2-Q6 |
| Bax | Cyp4f15 | Ftsj3 | H2-T10 |
| BC021614 | Cyp4f17 | Fzd8 | H2-T22; H2-T9 |
| BC089597 | Dapk1 | Gabrb3 | Hacl1 |
| Bcl2a1a | Dbt | Galnt10 | Hao2 |
| Bcl2a1d | Dcxr | Galnt4 | Hcfc1r1 |
| Bivm | Ddit3 | Gamt | Heatr1 |
| Bmp1 | Ddx58 | Gbp10; Gbp6 | Herc6 |
| Bmp8b | Ddx60 | Gbp11 | Hes6 |
| Bnip3 | Decr2 | Gbp2b; Gbp5 | Hgfac |
| Borcs8 | Defb1 | Gbp3 | Hint2 |
| Bphl | Dhx33 | Gbp4 | Hmox1 |
| Brix1 | Dhx37 | Gbp9 | Hn1 |

| | | | | |
|------------------------|-----------------|---------|----------|------------------------|
| Hpn | Mb21d1 | Pak1ip1 | Rars | Sp4 |
| Hps4 | Mccc2 | Pank1 | Rbbp9 | Spats2 |
| Hs3st3b1 | Mest | Papss2 | Rdh11 | Sqle |
| Hsbp1l1 | Mgam | Paqr9 | Rdh16 | Sqstm1 |
| Hsd11b1 | Mgea5 | Parp12 | Reep6 | Srd5a2 |
| Hsd17b7 | Mgll | Parp14 | Rfc2 | Srxn1 |
| Hsd3b1 | Mitd1 | Parp9 | Rgs1 | Sstr2 |
| Hspb1 | Mlkl | Pbld1 | Rhoc | St6galnac6; St6galnac4 |
| Hspbap1 | Mlxipl | Pcca | Rhod | Stab2 |
| Htra2 | Mmab | Pccb | Rnf213 | Stard4 |
| Hykk | Mmachc | Pcid2 | Rnf34 | Stat2 |
| Ifi35 | Mmp13 | Pde9a | Rock2 | Steap2 |
| Ifi44 | Mndal | Pdk1 | Rpn2 | Stx2 |
| Ifih1 | Mpst | Pdxk | Rsad2 | Sult2a8 |
| Ifit1 | Mpv17l2 | Pecr | Rtp4 | Sult3a1 |
| Ifit1b11 | Mrpl24 | Peg10 | Saa3 | Suox |
| Ifit2 | Mrpl34 | Pex7 | Samhd1 | Tcp11l2 |
| Ifit3 | Ms4a4b | Pfdn2 | Scap | Tesk2 |
| Ifit3b | Ms4a6b | Pgd | Scnn1a | Tfdp2 |
| Igfals | Msmo1 | Phf11a | Sec11c | Thoc6 |
| Il22ra1 | Mterf3 | Phf11b | Sell | Thtpa; Zfhx2os |
| Il2rg | Mup-ps19; Mup20 | Phkg2 | Selo | Timm21 |
| Impact | Mup20 | Phyhd1 | Sema4g | Tlcd2 |
| Inmt | Mut | Pik3c2g | Serf1 | Tlr1 |
| Irak1; Mir718; Mir5132 | Mx1 | Pkd2l2 | Serpine2 | Tlr2 |
| Irf7 | Mx2 | Pklr | Serpinf1 | Tlr3 |
| Irs2 | Myc | Plek | Serpinf2 | Tm2d2 |
| Isg15 | Myo5c | Pm20d1 | Sesn3 | Tmem184c |
| Isoc2a | Myo6 | Pmvk | Sfxn1 | Tmem256 |
| Itih1 | N4bp2 | Pnpo | Sfxn5 | Tmem43 |
| Ivd | Nabp1 | Polr3g | Sgsm1 | Tmem53 |
| Kdelc1 | Naglu | Ppfibp2 | Shb | Tmem97 |
| Kif3a | Nampt | Ppm1k | Shmt1 | Tmprss2 |
| Kitl | Ncald; Gm15941 | Prkra | Slc10a5 | Tnfrsf12a |
| Klf12 | Ndufa3 | Prlr | Slc11a1 | Tnfsf10 |
| Klf9 | Ndufaf3 | Prodh2 | Slc15a3 | Tor1b |
| Klk1b4 | Ndufv3 | Prpf19 | Slc16a10 | Tor3a |
| Klkb1; Cyp4v3 | Neto2 | Prpsap1 | Slc16a12 | Tox |
| Kptn | Nit2 | Prr14 | Slc16a2 | Tprkb |
| Krt18 | Nop56; Snord57 | Prss8 | Slc20a1 | Trim30a |
| Krt20 | Nqo1 | Prune | Slc22a28 | Trim34b; Trim34a |
| Krt8 | Nr1i3 | Psmb8 | Slc22a30 | Trmt10a |

| | | | | |
|----------|---------|-----------|---------------|---------|
| Lage3 | Nr5a2 | Psm5 | Slc25a23 | Tsc22d3 |
| Lgals3bp | Nrg1 | Psm8 | Slc25a42 | Tsku |
| Lilr4b | Nt5dc1 | Ptcd3 | Slc25a51 | Ttc36 |
| Lin7a | Nt5e | Pter | Slc29a1 | Ttc38 |
| Lmf1 | Nudt19 | Ptgr1 | Slc35b4 | Ttll7 |
| Lonp1 | Nudt2 | Ptprc | Slc35c2 | Uap1l1 |
| Lrp11 | Nup133 | Pvr | Slc35d1 | Ube2v2 |
| Lrrc3 | Nup62cl | Pwp2 | Slc35e3 | Ugdh |
| Lrsam1 | Nxt2 | Pxmp2 | Slc44a1 | Ugp2 |
| Lsg1 | Oaf | Pxmp4 | Slc47a1 | Ugt2a3 |
| Ly6a | Oas1a | Pydc3 | Slc4a7 | Ugt3a1 |
| Ly6c1 | Oas1g | Pydc4 | Slc6a12 | Ugt3a2 |
| Ly6c2 | Oasl2 | Pygo1 | Sfn5 | Ulk2 |
| Lyar | Odf3b | Pyhin1 | Sfn8 | Uqcr10 |
| Mafb | Ogfrl1 | Qdpr | Slpi; Mir7678 | Urm1 |
| Man2b2 | Ogt | Qsox1 | Snrpa1 | Uroc1 |
| Map2k6 | Orm1 | Rab11fip2 | Sox6 | Usp18 |
| Marchf2 | Pafah2 | Rabac1 | Sp100 | Vps28 |

Vps51; Tm7sf2
Vwa8
Wfdc2
Wfdc21
Wfdc3
Xaf1
Xdh
Yeats4
Yif1a
Zbp1
Zcchc24
Zcwpw1
Zfand4
Zfp65
Zfp729a
Zfp729b
Zpr1

TABLE S2. DE genes at 8 weeks

| | | | | | |
|-----------------|----------------|-------------|----------------|------------------|---------|
| 1600002H07Rik | Atp8a1 | Clstn1 | Epha3 | Gpm6a | Klf6 |
| 1700011H14Rik | Axl | Cmtm3 | Epha7 | Gpm6b | Klhl13 |
| 1700047I17Rik2 | B4galt6 | Cmtm3 | Ephx4 | Gpr65 | Krt19 |
| 2210013O21Rik | Bambi | Col1a1 | Erich5 | Gpx3 | Krt7 |
| 2610305D13Rik | Bcam | Col1a2 | Etl4 | Gsn | Lama2 |
| 6720489N17Rik | Bcl2 | Col3a1 | Ets2 | Gstm2 | Lamb1 |
| Aadat | Bgn | Col6a3 | Ezr | Gucy1a3; Mir7010 | Lamb2 |
| Abcd2 | Bicc1 | Cox18 | Fam105a | H2-Ab1 | Lamc1 |
| Abhd2 | C1qb | Cptp | Fam107a | H2-DMb1 | Lbh |
| Abi2 | C1qc | Creb3l1 | Fam177a | H2-M2 | Ldb1 |
| Abi3bp | C1qtnf7 | Crtap | Fam180a | Heph | Ldhd |
| Abr | C3ar1 | Csf1r | Fam19a2 | Hexa | Lgi2 |
| Ace | Cacnb3 | Csrp1 | Fam205a2 | Hexb | Lgmn |
| Acot9 | Cadm4 | Ctgf | Fam47e | Hgf | Lhfp |
| Acsf2 | Capn8 | Ctsk | Fbln1 | Hist1h2ak | Loxl1 |
| Actg1; Mir6935 | Car2 | Ctnnb2 | Fbln5 | Hnf4g | Loxl2 |
| Adamts1 | Casc4 | Cxcr4 | Fbn1 | Hnrnpa1 | Lpar1 |
| Adamts2 | Casp12 | Cygb | Fcgr3 | Hpgds | Lpl |
| Adamts5 | Cav2 | Cyp7b1 | Fcna | Hsd3b4 | Lrrcc1 |
| Adamts9 | Cbx6 | Cyp8b1 | Fermt1 | Hsd3b4 | Ltbp4 |
| Adamtsl2 | Ccdc3 | Cysltr1 | Fgfr3 | Htra1 | Lum |
| Add1; Mir7036b | Ccdc80 | D17H6S56E-5 | Fgl2 | Icosl | Ly86 |
| Adgre5; Mir1668 | Ccdc88a | Dab2 | Fhl2 | Idh2 | Lyz2 |
| Adgrg1 | Ccnd1 | Dcdc2a | Flrt2 | Ifi2712a | Macc1 |
| Adgrg6 | Cd14 | Dcn | Fmo2 | Ifi2712b | Mamdc2 |
| Adh6-ps1 | Cd163 | Ddah2 | Foxq1 | Ifi30 | Maml1 |
| Aebp1 | Cd24a | Ddit4l | Frzb | Ifngr1 | Map3k1 |
| Agpat4 | Cd300lh | Ddr2 | Fut10 | Ift57 | Map4k4 |
| Agrn | Cd300lh | Ddx26b | Fxyd5; Mir7050 | Igf1r | Marcks |
| Ahnak; Mir6367 | Cd34 | Dkk3 | Fzd1 | Igfbp3 | Mark1 |
| AI506816 | Cd36 | Dnal1 | G2e3 | Igfbp7 | Mbnl3 |
| Aldh1a2 | Cd52 | Dock10 | G6pdx | Ikbip | Mboat1 |
| Angpt1 | Cd68 | Dpt | Gabra3 | Il10rb | Mcm6 |
| Ankrd1 | Cd74; Mir5107 | Dpy19l3 | Gabrp | Islr | Meis2 |
| Ano1 | Cdh6 | Dpysl2 | Galnt3 | Itga3 | Mfge8 |
| Ano6 | Cdk14 | Efemp1 | Gas6 | Itga8 | Mgat4a |
| Antxr1 | Cerk | Efhd2 | Gdf10 | Itga9 | Mid1 |
| Anxa13 | Chchd7 | Efnb2 | Gem | Itgb5 | Mir3962 |
| Anxa2 | Chst15 | Egflam | Gfpt2 | Itgb6 | Mir6950 |
| Anxa3 | Cib3 | Ehd2 | Gja1 | Itgb8 | Mir7025 |
| Aoah | Clca3a1; Clca1 | Ehf | Gldn | Itgbl1 | Mir7677 |
| Apobec3 | Clca3a2; Clca2 | Elf4 | Gm10052 | Itm2c | Mmp14 |

| | | | | | |
|-----------------|--------|-------|---------|----------|--------|
| App | Cldn4 | Emb | Gm10600 | Itpr3 | Mmp2 |
| Arg2 | Cldn7 | Emp1 | Gm11710 | Itpripl2 | Moxd1 |
| Arhgdib | Cldn8 | Emp2 | Gm11711 | Jag1 | Mrc2 |
| Arhgef6 | Clec4n | Emp3 | Gm11711 | Jchain | Ms4a4a |
| Arpc1b | Clic1 | Eng | Gm609 | Kalrn | Ms4a4d |
| Art4 | Clic6 | Enho | Gng2 | Kcnma1 | Muc1 |
| Atp2b4; Mir6903 | Clmp | Enkur | Golm1 | Kifc3 | Mxra8 |
| Atp6v0d2 | Cln6 | Epcam | Gpc3 | Klf5 | Myadm |

| | | | |
|----------|----------|---------------|---------------|
| Mybl1 | Pcdhgc3 | Rbl1 | Tmem229b |
| Myh9 | Pcdhgc4 | Rbm3 | Tmem45a |
| Myo1d | Pcdhgc5 | Rbms1 | Tmem47 |
| Myo7a | Pde1a | Rbms3 | Tmsb10 |
| Nav1 | Pdgfc | Rbp1 | Tmsb4x |
| Ncam1 | Pdgfd | Rcn1 | Tnc |
| Ncoa7 | Pdgfra | Rgs2 | Tnfrsf19 |
| Ndrgr1 | Pdgfrb | Rhob | Tns1 |
| Nedd9 | Pdzk1ip1 | Rhoj | Tns3 |
| Nek5 | Pea15a | Rnasel | Tox3 |
| Ngfrap1 | Pear1 | Robo1 | Tpm4 |
| Nipal1 | Phactr2 | Robo2 | Tpr |
| Nipal2 | Phlda1 | Rragd | Trib1 |
| Nmnat1 | Phldb2 | Rtn4 | Trove2 |
| Nox4 | Pirb | S100a11 | Tspan3 |
| Npcd | Pisd-ps3 | Scara3 | Tspan8 |
| Npr2 | Pkd2 | Scarf2 | Ttc3 |
| Nptxr | Pkhd1 | Sccpdh | Tuba1a |
| Nt5c3b | Plat | Scd2; Mir5114 | Ucp2 |
| Nudt7 | Pld4 | Sdr9c7 | Ugt2b38 |
| Obp2a | Plekha2 | Selenbp2 | Unc5b |
| Ogn | Plekho1 | Selm | Veph1 |
| Olfml3 | Plet1 | Selplg | Vgl3 |
| Osmr | Plk2 | Sema3c | Vim |
| Pacs1 | Plod2 | Sema3f | Wbp5 |
| Pam | Plp2 | Sema5a | Wfdc15b |
| Pamr1 | Plxdc2 | Sema6a | Wls |
| Parm1 | Plxna4 | Septin11 | Wwc2 |
| Parp8 | Ppic | Septin8 | Zeb2; Mir5129 |
| Pawr | Ppp1r9b | Serpib6a | |
| Pbk | Prelp | Serpinh1 | |
| Pcdhga1 | Prex2 | Sestd1 | |
| Pcdhga10 | Prkch | Sftpd | |
| Pcdhga11 | Prom1 | Sh2d4a | |
| Pcdhga12 | Prr15l | Sh3kbp1 | |
| Pcdhga2 | Prrg1 | Tgfb2 | |
| Pcdhga3 | Ptger4 | Tgfb3 | |
| Pcdhga4 | Ptgfrn | Tgfb1 | |
| Pcdhga5 | Ptpn13 | Thbs1 | |
| Pcdhga6 | Ptpn14 | Thbs2 | |
| Pcdhga7 | Ptprm | Tiam2 | |
| Pcdhga8 | Ptprs | Timp2 | |

| | | |
|---------|---------|----------|
| Pcdhga9 | Pxdn | Timp3 |
| Pcdhgb1 | Rab27b | Tinag |
| Pcdhgb2 | Rab31 | Tlr4 |
| Pcdhgb4 | Rab8b | Tlr7 |
| Pcdhgb5 | Ralgds | Tm4sf1 |
| Pcdhgb6 | Rarres1 | Tmem106a |
| Pcdhgb7 | Rasef | Tmem173 |
| Pcdhgb8 | Rassf9 | Tmem189 |

TABLES3. DE genes common to 4 and 8 weeks

| | |
|--------------------------------|----------------|
| 9230110C19Rik | Ifi204 |
| 9930111J21Rik1; 9930111J21Rik2 | Ifi27 |
| 9930111J21Rik2 | Iqgap1 |
| Abcb1a | Laptm5 |
| Adora1 | Lenep; Flad1 |
| Aebp2 | Lifr |
| AI607873 | Lilrb4a |
| Ajuba | Ly6e |
| Alcam | Mgst3 |
| Anxa5 | Mmp12 |
| Bcl2a1b; Bcl2a1a | Mnda |
| Capsl | Mpv17l |
| Ccl22 | Ms4a4c |
| Ccr2 | Ms4a6c |
| Cd180 | Ms4a6d |
| Cd44 | Ms4a7 |
| Cd53 | Myl12a |
| Cd63 | Myof |
| Cd9 | Nid1 |
| Cetn4 | Npnt |
| Chic1 | Ntrk2 |
| Clec12a | P2ry4 |
| Clec7a | Pafah1b3 |
| Csprs | Phf11d; Phf11c |
| Ctss | Pla2g7 |
| Cxcl16 | Plac8 |
| Cybb | Plekhb1 |
| Elovl7 | Pygb |
| Epb41l4a | Retsat |
| Evi2a; Evi2b; Gm21975 | Samd9l |
| F2rl1 | Septin6 |
| Fads3 | Sirpa |
| Fgf1 | Slamf7 |
| Flna | Slamf9 |
| Fn3krp | Slc22a26 |
| Glipr1 | Slc25a45 |
| Gm13212 | Slfn2 |
| Gm2399 | Spi1 |
| Gm3934 | Tceal8 |
| Gm5431 | Tcf24 |
| Gm9844 | Tlr13 |
| Gpnmb | Tmem176b |

Gstm3
H2-Aa
H2-DMb2
H2-Eb1
Haus8
Hcls1
Ido2
Ifi203

Tmem19
Tnfaip3
Vcam1

TABLES4. Primer sequences

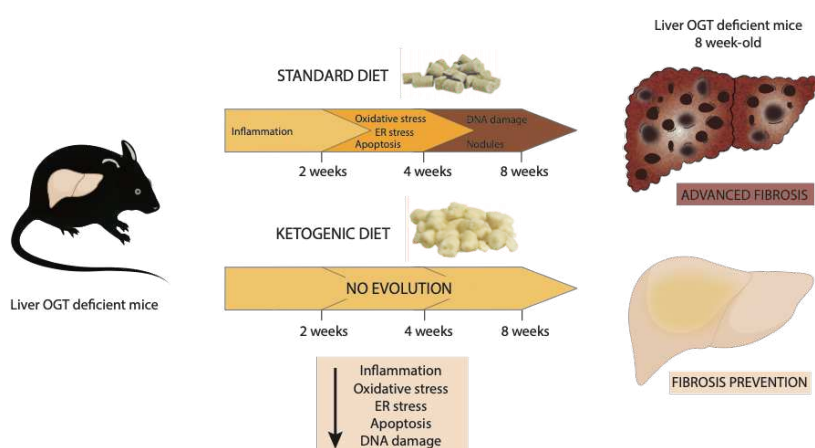
| Name | Sequence |
|----------------------------------|---------------------------------|
| Ccl5 F | CTG ACC CTG TAT AGC TTC CCT |
| Ccl5 R | GGG ATT ACT GAG TGG CAT CC |
| Chop F | AAG GAG AAG GAG CAG GAG AAC |
| Chop R | GGT ACA CTT CCG GAG AGA CAG |
| Col3a1 F | CTGTAACATGGAAACTGGGGAAA |
| Col3a1 R | CCATAGCTGAACTGAAAACCACC |
| Col6a1 F | CTGCTGCTACAAGCCTGCT |
| Col6a1 R | CCCCATAAGGTTTCAGCCTCA |
| CycA2 F | TGC CTT CAC TCA TTG CTG GA |
| CycA2 R | TGT GGC GCT TTG AGG TAG GT |
| CycB1 F | TGC CTT TGT CAC GGC CTT AG |
| CycB1 R | GGA AAT TCT TGA CAA CGG TG |
| CycD F | GCG TAC CCT GAC ACC AAT CTC |
| CycD R | CTC CTC TTC GCA CTT CTG CTC |
| CycE F | CAGAGCAGCGAGCAGGAGA |
| CycE R | CAGCTGCTTCCACACCACTG |
| F4/80 F | CTT TGG CTA TGG GCT TCC AGT C |
| F4/80 R | GCA AGG AGG ACA GAG TTT ATC GTG |
| Gpx3 F | GCC ATT TGG CTT GGT CAT TC |
| Gpx3 R | TGG GGA GTA TCT CCG AGT TC |
| Gpx4 F | GCA CGA ATT CTC AGC CAA GG |
| Gpx4 R | CAA ACT GGT TGC AGG GGA AG |
| Gcle F | CTG CAC ATC TAC CAC GCA GT |
| Gcle R | TTC ATG ATC GAA GGA CAC CA |
| Gss F | GAAGCAGCTCGAAGAACTGG |
| Gss R | AGCACTGGGTACTGGTGAGG |
| Gsta1 F | CCA GAG CCA TTC TCA ACT A |
| Gsta1 R | TGC CCA ATC ATT TCA GTC AG |
| Gstm1 F | CTACCTTGCCCGAAAGCAC |
| Gstm1 R | ATGTCTGCACGGATCCTCTC |
| Gstm3 R | TGA AGG CCA TCC CTG AGA AA |
| Gstm3 F | CTT GGG AGG AAG CGG CTA CT |
| Gstm5 R | AGA TAC ATC GCA CGC AAG CA |
| Gstm5 F | CCA TGT GAA TTT CCC CAG GA |
| Hnf4α F | TGCCTGCCTCAAAGCCAT |
| Hnf4α R | CACTCAGCCCCTTGGCAT |
| HO-1 F | GTCAAGCACAGGGTGACAGA |
| HO-1 R | ATCACCTGCAGCTCCTCAA |
| Il-1β F | GGGCCTCAAAGGAAAGAATC |
| Il-1β R | TACCAGTTGGGAACTCTGC |

| | |
|---------------------------------|---------------------------------|
| Kl67 F | AGG ATG GAA GCA AGC CAA CA |
| Kl67 R | GGC CCT TGG CAT ACA CAA AA |
| Krt7 F | CACCCGGAATGAGATTGCG |
| Krt7 R | GCACGCTGGTTCTTCAAGGT |
| Krt19 F | TGCTGGATGAGCTGACTCTG |
| Krt19 R | AATCCACCTCCACACTGACC |
| Mcp1 F | TGAATGTGAAGTTGACCCGT |
| Mcp1 R | AGAAGTGCTTGAGGTGGTTG |
| Nq01 F | AGC GTT CGG TAT TAC GAT CC |
| Nq01 R | AGT ACA ATC AGG GCT CTT CTC G |
| Nrf2 F | TTC TTT CAG CAG CAT CCT CTC CAC |
| Nrf2 R | ACA GCC TTC AAT AGT CCC GTC CAG |
| Oga F | TTCACTGAAGGCTAATGGCTCCCG |
| Oga R | TGTCACAGGCTCCGACCAAGT |
| Ogt F | TCGCACAGCTCTGTCAAAAA |
| Ogt R | GCCCTGGGTCGCTTGGAAGA |
| Phgdh F | GGAGGAGATCTGGCCTCTCT |
| Phgdh R | GCACACCTTTCTTGCACTGA |
| αSma F | TGA CCC AGA TTA TGT TTG AGA CC |
| αSma R | CCA GAG TCC AGC ACA ATA CCA |
| Tbp F | CCCCACAACCTTCCATTCT |
| Tbp R | GCAGGAGTGATAGGGGTCAT |
| Tgfβ F | TGAGTGGCTGTCTTTTGACG |
| Tgfβ R | AGTGAGCGCTGAATCGAAAG |
| Tnfα F | TGGGAGTAGACAAGGTACAACC |
| Tnfα R | CATCTTCTCAAAAATTCGAGTGAC |



Conclusions

Notre étude montre que l'inactivation génique de l'OGT dans les hépatocytes entraîne de graves lésions hépatiques, confirmant que la O-GlcNAcylation et l'OGT sont essentielles à l'homéostasie et à la survie des hépatocytes. Notre étude met en avant un nouveau modèle intéressant de la fibrose hépatique avancée grâce à la délétion spécifique de l'OGT dans le foie. Compte tenu de l'intérêt croissant pour la recherche d'approches thérapeutiques pour la prévention de la fibrose et/ou le traitement des maladies du foie, le modèle de souris OGT^{LKO} pourrait être d'un grand intérêt pour tester et/ou valider des médicaments anti-fibrotiques.



Objectif n°2 : Caractérisation du phénotype des souris présentant une délétion inductible de l'OGT dans le foie

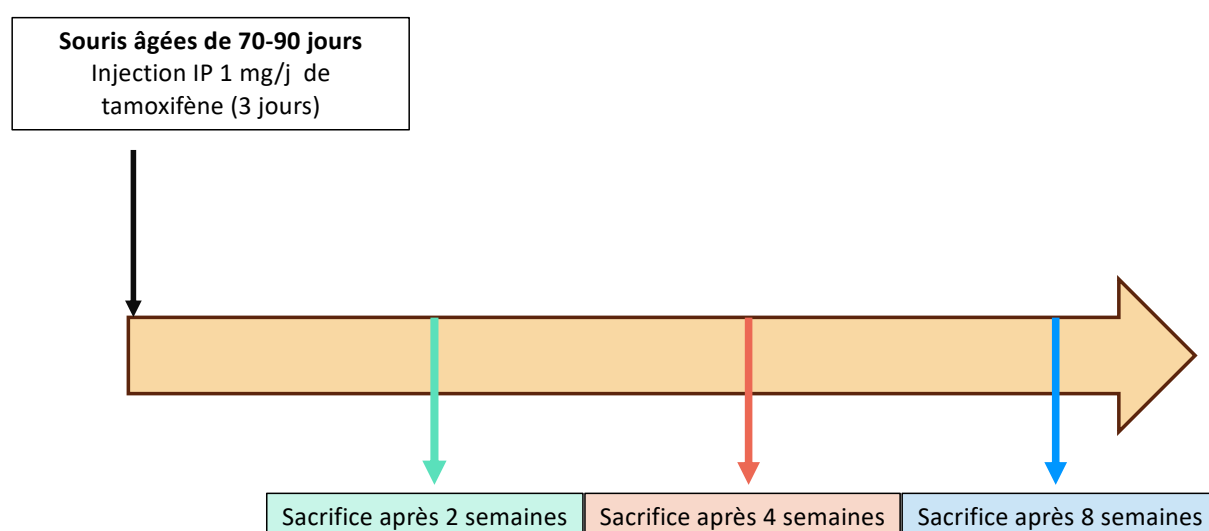
Matériels et méthodes

Génération de souris OGT^{INDLKO}

Des souris transgéniques exprimant une recombinaise Cre inducible par le tamoxifène sous le contrôle du promoteur de la transthyréline (TTR-Cre ind) ont été utilisées pour obtenir des souris avec une délétion inducible de l'OGT hépatocytaire (OGT^{INDLKO}). Nous avons injecté des souris âgées de 70 à 90 jours avec du tamoxifène au dosage de 1 mg/jour en intra-péritonéal (IP) pendant 3 jours (Tannour-Louet et al. 2002).

Les souris OGT^{flox} sont floxées de chaque côté des exons 6-7 codant pour les acides aminés 206 et 232. Ces souris ont été obtenues auprès de Jackson Laboratoires (JAX stock #00486).

Les souris ont été sacrifiées après 2, 4 et 8 semaines après l'injection du tamoxifène.



Analyse par cytométrie en flux

Des suspensions cellulaires préparées à partir de foie ont été collectés à 4° C dans un tampon FACS (1 × PBS contenant 2% FBS et 2 mM EDTA). Le marquage des cellules a été réalisé avec les anticorps suivants conjugué au fluorochrome : TCRβ (H57-597, 1/200, #109241), CD3 (17A2, 1/50, #100236), CD4 (RM4-5BL, 1/100, #100526), CD8 (53-6.7, 1/100, #100742), CD69 (H1.2F3, 1/100, #104509), F4/80 (BM8, 1/100, #123147), Ly6C (HK1.4, 1/200, #128041), CD19 (6D5, 1/200, #115553), CLEC-2 (17D9#146105), CD11c (N418, 1/100, #117316), CCR2 (SA203G11, 1/100, #150613), NK1.1 (PK136, 1/50, #108727) et Tim-4 (RMT-54, 1/200, #130009) (AcM obtenus

auprès de BioLegend, France) ; CD45 (30-F11, 1/200, #560510), CD11b (M1/70, 1/50, #560456), Ly6G (IA8, 1/200, #560602) et TCR $\gamma\delta$ (GL3, 1/500, #563532) (AcM obtenus auprès de BDBiosciences). Les cellules mortes ont été exclues de l'analyse à l'aide du colorant de viabilité fixable eFluor 506 (1/200, #65-0866-14, eBiosciences). L'analyse par cytométrie en flux a été réalisée en collaboration avec l'Équipe « Réponses inflammatoires et stress dans les maladies chroniques du foie (INVOLVED) » (UMR 1149 Inserm – Université Paris Cité – ERL CNRS 8252)

Analyse transcriptomique par RNA-Seq et analyses bioinformatiques

Les ARNs totaux issus de foies de souris OGT^{LWT} (6 échantillons) ou OGT^{INDLKO} (6 échantillons) ont été extraits au Trizol® selon la méthode classiquement utilisée. L'intégrité des ARN a été vérifiée au Bioanalyseur 2100 (Agilent) et quantifiée grâce au QubitTM double stranded DNA (dsDNA) High-Sensitivity HS assay (ThermoFisher Scientific). Les bibliothèques d'ADN double brins ont été séquencées par paires en utilisant le séquenceur Illumina Nextseq 500. Les données brutes obtenues par le séquenceur ont été démultiplexées pour obtenir une bibliothèque unique de fichiers FASTQ. L'analyse du RNA-Seq et la détection des gènes différentiellement exprimés a été faite en utilisant le serveur Galaxy. Dans un premier temps, la qualité des reads a été évaluée en utilisant FastQC et Cutadapt. Les reads sont ensuite alignés au génome de référence (souris mm10, Séquence : GRCm38 Ensembl 93) en utilisant HISAT2. Une fois les séquences mappées obtenues, les nombres de « reads » par gène sont quantifiés en utilisant Featurecounts. Des rapports sur la qualité des « reads » sont obtenus à chaque étape grâce à MultiQC. La commande DESeq2 est ensuite utilisée sur les « reads » pour les normaliser et extraire les gènes différentiellement exprimés (DEG). Les fonctions Heatmap2 et VolcanoPlot permettent finalement de visualiser les DEG et l'analyse en enrichissement fonctionnelle est réalisée avec GoSeq.

Résultats

Nous avons observé que la délétion constitutive de l'OGT à un stade précoce du développement a des effets délétères hépatiques. Afin d'élucider les conséquences de la délétion de l'OGT indépendamment de tout facteurs confondant associés au développement post-natal, nous avons développé un modèle avec une délétion de l'OGT hépatocytaire à l'âge adulte.

1) La délétion de l'OGT hépatocytaire à l'âge adulte entraîne un stress oxydant et des lésions hépatiques 2 semaines après l'induction de la délétion.

Deux semaines après la délétion de l'*Ogt* hépatocytaire, nous n'avons pas observé de différences du poids corporel, du poids du foie ou de la rate chez les souris OGT^{INDLKO} par rapport aux souris OGT^{LWT} (**Figure 36A**). Les niveaux d'ARNm de l'*Ogt*, de la protéine OGT et des protéines hépatiques O-GlcNAcylées étaient significativement réduits dans le foie des souris OGT^{INDLKO} (**Figures 36B et 36D**), confirmant l'efficacité de la délétion induite par l'injection de tamoxifène. En parallèle, nous avons observé une diminution significative de l'expression de l'*Oga* dans le foie, un mécanisme compensatoire déjà observé dans le modèle de délétion constitutif de l'OGT et déjà décrit pour la régulation de l'équilibre OGT-OGA (Park et al., 2017) (**Figure 36C**). De plus, nous avons mis en évidence une augmentation modeste mais significative des niveaux de protéines c-Jun, dans le foie des souris OGT^{INDLKO}. Nous n'avons pas observé d'augmentation de des niveaux de la protéine CHOP (**Figure 36D**). Les analyses histologiques ont révélé une fibrose initiale (coloration Sirius Red) et une activation des fibroblastes hépatiques (immunomarquage α SMA) dans le foie des souris OGT^{INDLKO} par rapport aux souris contrôles OGT^{LWT} (**Figure 36E**). Au niveau génique, nous avons observé une tendance à l'augmentation de l'expression des marqueurs de fibrose (α SMA, *Col3a1* et *Col6a1*) dans le foie des souris OGT^{INDLKO} par rapport aux souris OGT^{LWT} (**Figure 36I**).

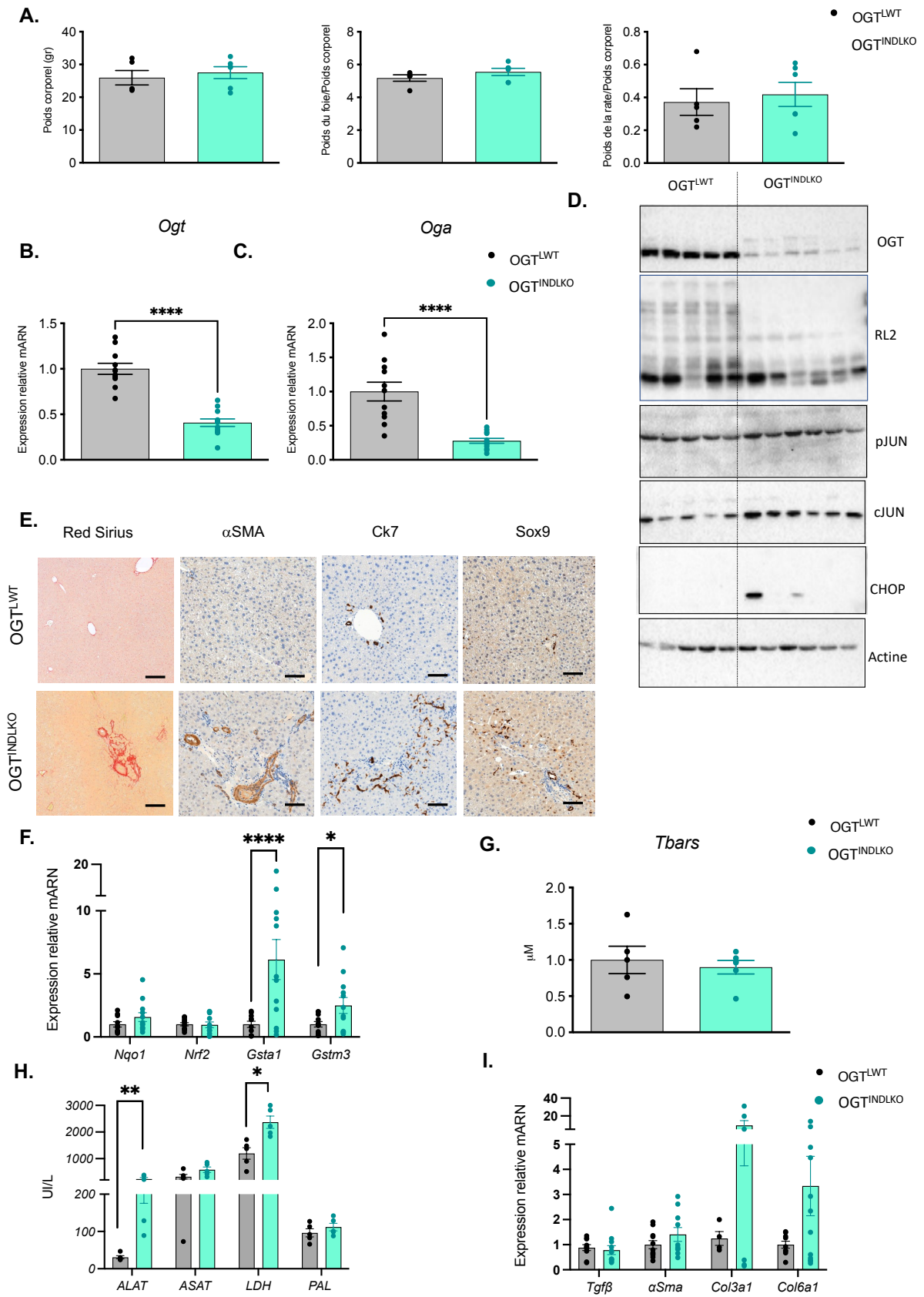


Figure 36. L'inhibition spécifique de l'OGT dans les hépatocytes à l'âge adulte entraîne un stress oxydant, des lésions hépatiques et une fibrose initiale du foie 2 semaines après la délétion

A. Poids corporel (g), poids du foie et de la rate. **B.** Expression relative de l'Ogt normalisée par rapport à l'expression de la GAPDH. **C.** Expression relative de l'Oga normalisée par rapport à l'expression de la GAPDH. **D.** Analyse par Western blot des niveaux d'OGT, protéines O-GlcNAcylées (RL2), pJUN, cJUN, CHOP dans des lysats totaux de foie de souris OGT^{LWT} et OGT^{INDLKO}. L'actine a été utilisé comme contrôle de charge. Cinq et six échantillons représentatifs sont présentés par condition. **E.** Coupes de foie colorées par Sirius Red, α SMA, Ck7 et Sox9. Barres d'échelle = 100 μ m et =200 μ m pour la coloration Sirius Red. **F.** Niveaux relatifs d'expression des marqueurs de stress oxydant normalisés par rapport à l'expression de la GAPDH. **G.** Concentrations des Tbars (substances réactives à l'acide thiobarbiturique) dans des lysats totaux de foie. **H.** Concentrations sériques d'alanine aminotransférase (ALAT), d'aspartate aminotransférase (ASAT), de lactate déshydrogénase (LDH) et de phosphatase alcaline (PAL). **I.** Niveaux relatifs d'expression des marqueurs de fibrose normalisés par rapport à l'expression de la GAPDH. Les données sont présentées sous forme de moyenne \pm SEM de 5 à 10 souris individuelles mâles ou femelles. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ par test t de Student non apparié (Mann-Whitney).

De plus, une coloration positive pour Ck7 et SOX9 dans le foie de souris OGT^{INDLKO} suggère des lésions hépatiques et une réaction ductulaire émergentes, avec activation des cellules progénitrices hépatiques (**Figure 36E**). En effet, une augmentation significative des concentrations des marqueurs de lésion hépatique ALAT et LDH a été observée alors que celles des deux autres marqueurs, les concentrations des ASAT et des PAL ne sont pas différentes entre les deux groupes de souris (**Figure 36H**). Une augmentation significative de l'expression des gènes du stress oxydant (*Gsta1* et *Gstm3*) a été également observée dans le foie des souris OGT^{INDLKO} par rapport aux souris contrôles OGT^{LWT} (**Figure 36F**).

Nous n'avons cependant pas observé de modification des concentrations des Tbars (substances réactives à l'acide thiobarbiturique) (**Figure 36G**), un marqueur de la peroxydation des lipides.

Dans l'ensemble, nos résultats révèlent que la délétion hépatique de l'OGT à l'âge adulte induit un stress oxydant, une inflammation et une fibrose initiales et des signes précoces d'atteinte hépatique dès 2 semaines de délétion de l'Ogt.

2) Caractérisation des populations immunitaires dans le foie des souris

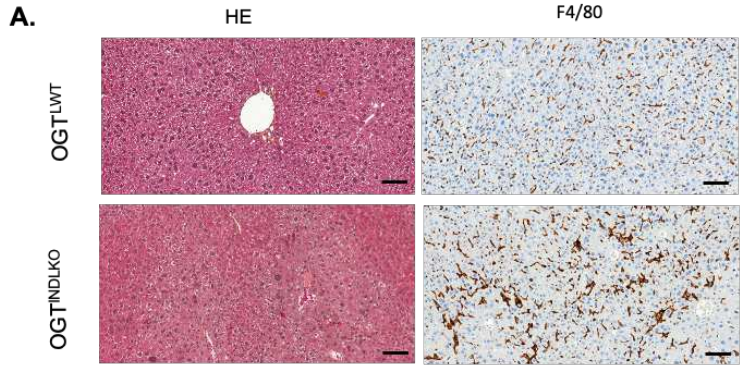
OGT^{INDLKO}

Compte tenu de l'observation d'une inflammation hépatique très précoce dans notre modèle et de l'importance de la composante immunitaire dans la physiopathologie hépatique, nous avons voulu caractériser les populations immunitaires dans le foie des souris OGT^{INDLKO}. L'analyse par FACS du panel des cellules lymphocytaires a permis de mettre en évidence une diminution des cellules T TCRαβ⁺ associée à une baisse des cellules T CD4⁺ (**Figure 37B**) ainsi qu'une diminution des cellules T CD3⁺ (**Figure 37E**) dans le foie des souris OGT^{INDLKO} comparé aux souris témoins. Aucune variation des autres types cellulaires lymphocytaires n'a pu être observée. De la même façon, nous n'avons pas mis en évidence de changement de l'état d'activation des lymphocytes (**Figure 37C**), à l'exception d'une réduction de l'activation des cellules NK (basée sur l'expression de CD69) dans le foie des souris OGT^{INDLKO} (**Figure 37D**). De manière globale, nous n'avons pas observé de changement majeur du panel lymphocytaire entre les deux groupes de souris, à l'exception d'une diminution des lymphocytes T CD4⁺ dans le foie des souris OGT^{INDLKO}, phénomène fréquemment observé dans les maladies hépatiques chroniques.

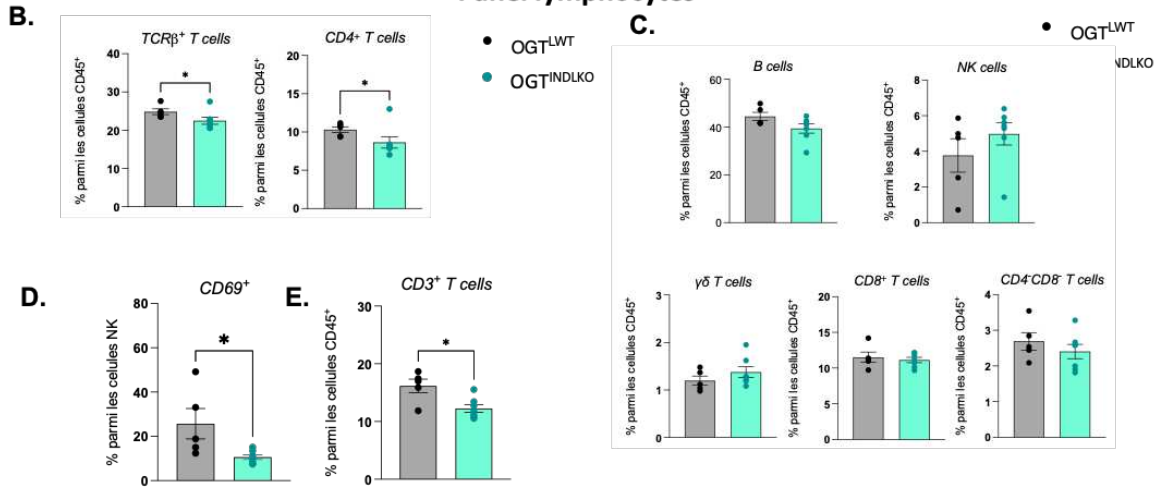
Des différences ont été observées pour le panel des cellules myéloïdes, où une diminution des cellules de Kupffer (KC)⁺ a pu être mise en évidence dans les foies des souris OGT^{INDLKO} (**Figure 37F**). De plus, une augmentation des macrophages totaux (MoMacs) et des macrophages F4/80⁺ et CD11b⁺ a été observée et ceci était associée à une augmentation des macrophages pro-inflammatoires Ly6C^{hi} (**Figure 37I**). Nous avons également observé une augmentation des deux sous-ensembles de cellules dendritiques conventionnelles (**Figure 37H**) et une tendance à l'augmentation des neutrophiles (**Figure 37G**). En résumé, nous avons observé une différence dans les populations de cellules immunes dans le foie des souris OGT^{INDLKO} : i) une augmentation des populations de Ly6C^{hi} MoMac pro-inflammatoires, phénomène courant dans le processus de fibrogènes (Mabire et al., 2023), ii) une augmentation des deux sous-ensembles de cellules dendritiques conventionnelles et iii) une tendance à l'augmentation des neutrophiles, un phénomène courant lors de l'inflammation tissulaire hépatique (Wang et Liu, 2021). Ces modifications de l'infiltrat inflammatoire hépatique s'associent à une altération initiale de l'architecture hépatique et à une différence significative à l'immunomarquage F4/80 (**Figure 37A**).

3) Analyse par RNAseq des transcrits différentiellement exprimés dans le foie des souris OGT^{INDLKO}

Pour élucider les mécanismes responsables des anomalies hépatiques observées chez les souris OGT^{INDLKO} nous avons réalisé une analyse RNASeq dans le foie de ces souris 2 semaines post-délétion. Par une analyse des transcrits différentiellement exprimés dans le foie, nous avons observé une augmentation significative des voies de réparation de l'ADN (réparation des « mismatches », réparation par excision des nucléotides), du cycle cellulaire et de la senescence cellulaire dans le foie des souris OGT^{INDLKO}, et au contraire une réduction significative des gènes impliqués dans le métabolisme des acides biliaires, dans les voies métaboliques, dans la détoxification des médicaments, dans la cascade du complément et de la coagulation et de l'autophagie (**Figure 38**).



Panel lymphocytes



Panel cellules myéloïdes

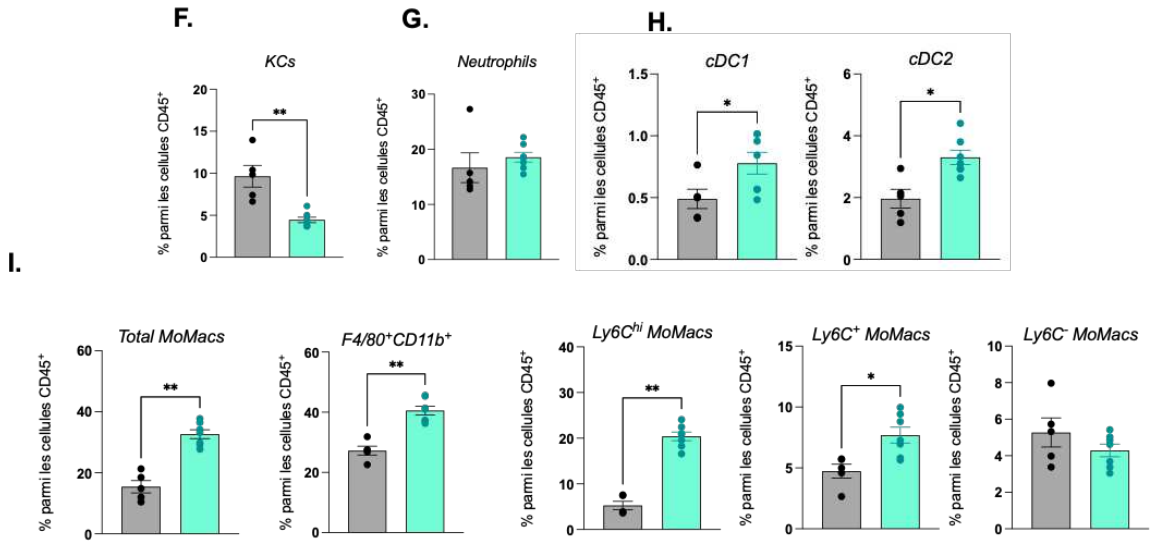


Figure 37. L'inhibition de l'OGT dans les hépatocytes à l'âge adulte entraîne une inflammation hépatique 2 semaines après la délétion

A. Coupes de foie colorées par hématoxyline-éosine (HE) et immunomarquage F4/80. Barres d'échelle = 100 μ m. **B-E.** Analyses par FACS du panel des lymphocytes. **F-I.** Analyse par FACS du panel des cellules myéloïdes. Les données sont présentées sous forme de moyenne \pm SEM de 5 à 6 souris mâles individuelles. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ par test t de Student non apparié (Mann-Whitney).

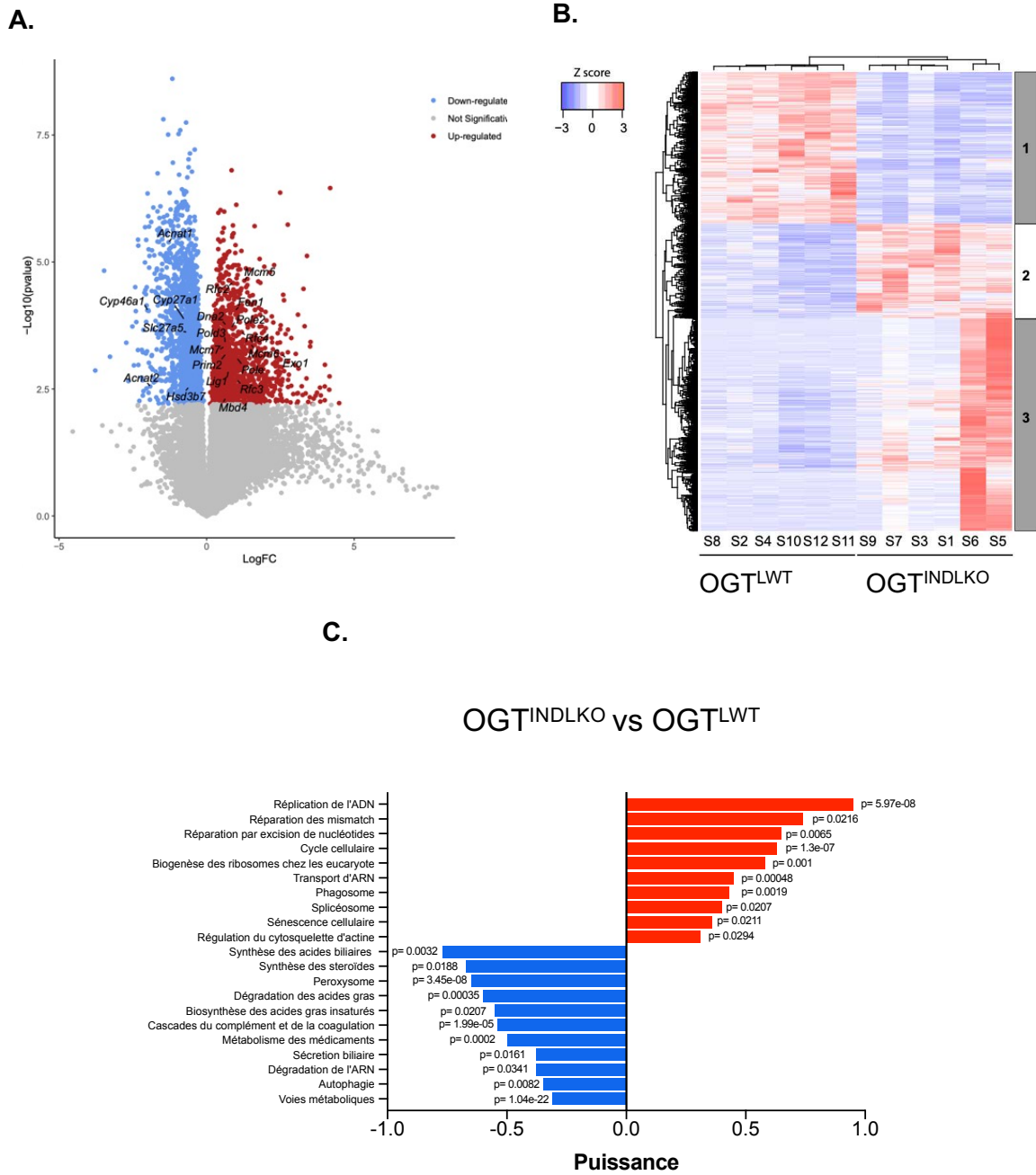


Figure 38: L'analyse par RNASeq révèle des changements transcriptionnels significatifs dans le foie des souris OGT^{INDLKO} comparées aux souris OGT^{LWT} 2 semaines de délétion

A. Volcano plot représentant les gènes différentiellement exprimés dans le foie des souris OGT^{INDLKO} comparées aux souris OGT^{LWT}. **B** Heatmap montrant l'expression différentielle des gènes dans le foie des souris OGT^{INDLKO} comparées aux souris OGT^{LWT}. Trois différents clusters ont été identifié. **C.** Voies significativement « up-régulées » ou « down-régulées » dans le foie des souris OGT^{INDLKO} comparées aux souris OGT^{LWT}.

4) La délétion de l'OGT dans l'hépatocyte à l'âge adulte entraîne un stress oxydant et du RE et des lésions hépatiques 4 semaines après l'induction de la délétion

Quatre semaines après la délétion de l'*Ogt* hépatocytaire, nous n'avons pas observé de différences du poids corporel ou du poids de la rate chez les souris OGT^{INDLKO} par rapport aux souris OGT^{LWT} (**Figure 39A**). Les souris OGT^{INDLKO} présentaient cependant une augmentation du poids du foie par rapport aux témoins (**Figure 39A**). Nous avons confirmé la réduction significative des niveaux d'ARNm de l'*Ogt* et de l'*Oga*, de la protéine OGT et des protéines O-GlcNAcylées dans le foie des souris OGT^{INDLKO} (**Figures 39B, 39C et 39D**). De plus, nous avons mis en évidence une augmentation des niveaux de protéines pJun, pNfKB et CHOP, dans le foie des souris OGT^{INDLKO} (**Figure 39D**). L'analyse histologique montre l'émergence d'une fibrose hépatique (coloration Sirius Red) (**Figure 39E**) ainsi que l'activation des fibroblastes hépatiques (immunomarquage α SMA, figures non montrées) dans le foie des souris OGT^{INDLKO} par rapport aux souris OGT^{LWT}.

De plus, la coloration positive pour Ki67, Ck7 et SOX9 dans le foie de souris OGT^{INDLKO} suggère des lésions hépatiques émergentes, une prolifération hépatique augmentée et une réaction ductulaire avec activation des cellules progénitrices hépatiques (**Figures 39E et 39G**). En effet, une augmentation significative des marqueurs de lésion hépatique alanine aminotransférase (ALAT), aspartate aminotransférase (ASAT) et lactate déshydrogénase (LDH) a été observée en association avec une augmentation du marqueur de cholestase (phosphatase alcaline (PAL) chez les souris OGT^{INDLKO} par rapport aux témoins (**Figure 39H**). Enfin, une induction significative de l'expression des gènes du stress oxydant (*Nqo1*, *Gsta1*, *Gstm3* et *Gpx4*) a pu être observée dans le foie des souris OGT^{INDLKO} par rapport aux souris témoins (**Figure 39F**).

Dans leur ensemble, nos résultats révèlent que la délétion hépatique de l'OGT à l'âge adulte induit un stress oxydant et du RE, une fibrose initiale et des signes précoces d'atteinte hépatique 4 semaines après l'induction de la délétion de l'*Ogt* hépatocytaire.

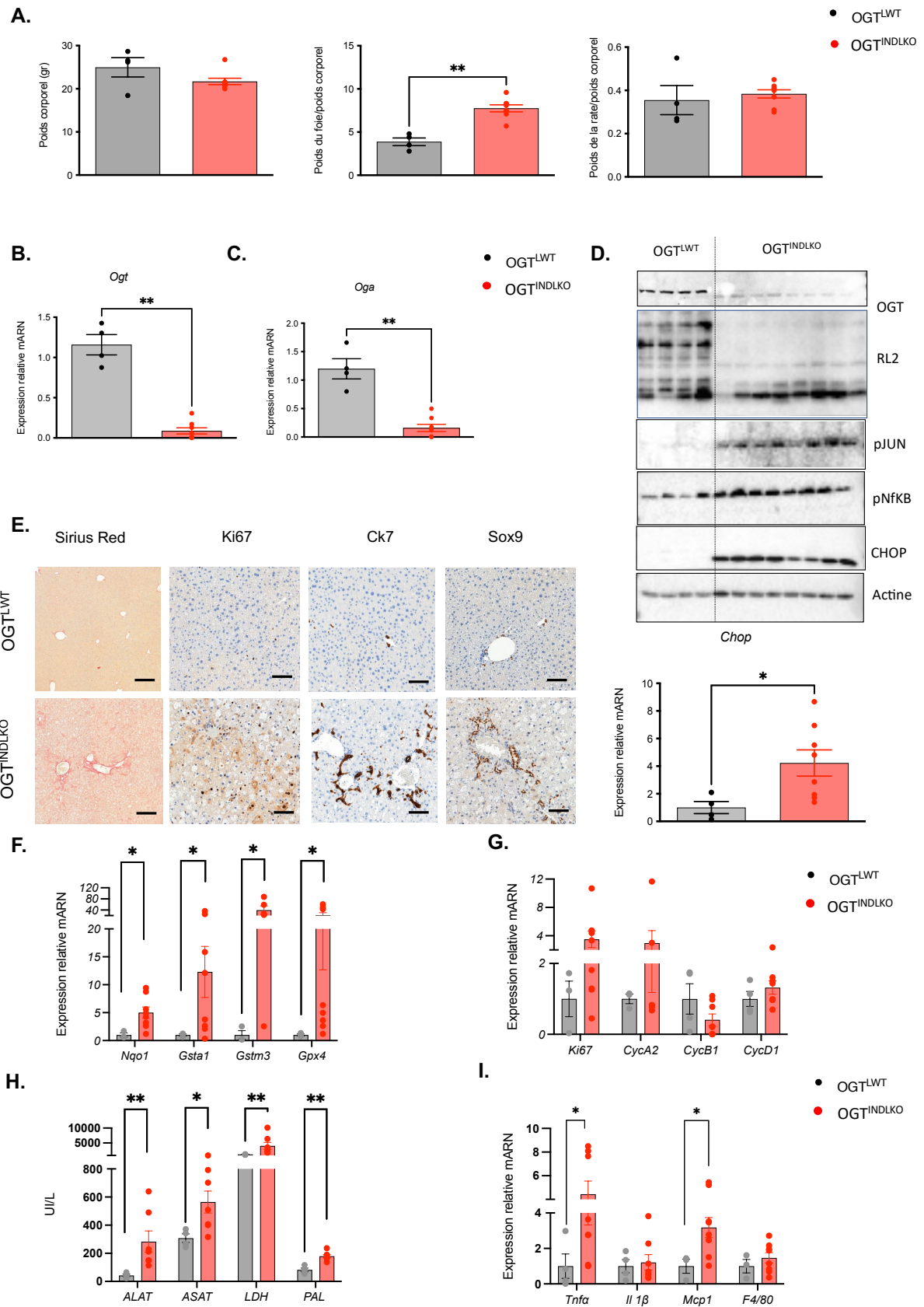


Figure 39. L'inhibition de l'OGT dans l'hépatocyte à l'âge adulte entraîne un stress oxydant, un stress du RE, des lésions hépatiques et une fibrose initiale du foie 4 semaines après l'induction de la délétion

A. Poids corporel (g), poids du foie et de la rate. **B.** Expression relative de l'Ogt normalisée par rapport à l'expression de la GAPDH. **C.** Expression relative de l'Oga normalisée par rapport à l'expression de la GAPDH. **D.** Analyse par Western blot des niveaux d'OGT, protéines O-GlcNAcylées (RL2), pJUN, pNfKB, CHOP par rapport à l'expression de la GAPDH dans des lysats totaux de foie. L'actine a été utilisé comme contrôle de charge. Quatre et huit échantillons représentatifs sont présentés par condition. **E.** Coupes de foie colorées par Sirius Red, α SMA, Ck7 et Sox9. Barres d'échelle = 100 μ m et =200 μ m pour la coloration Sirius Red. **F.** Niveaux relatifs d'expression des marqueurs du stress oxydant normalisés par rapport à l'expression de la GAPDH. **G.** Niveaux relatifs d'expression des marqueurs de prolifération normalisés par rapport à l'expression de la GAPDH. **H.** Concentrations sériques d'alanine aminotransférase (ALAT), d'aspartate aminotransférase (ASAT), de lactate déshydrogénase (LDH) et de phosphatase alcaline (PAL). **I.** Expression relative des marqueurs de l'inflammation normalisée par rapport à l'expression de la GAPDH. Les données sont présentées sous forme de moyenne \pm SEM de 4 à 8 souris mâles ou femelles. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ par test t de Student non apparié (Mann-Whitney).

5) Les souris OGT^{INDLKO} présentent un phénotype d'inflammation, de fibrose hépatique étendue et une réaction ductulaire 8 semaines après l'induction de la délétion

Pour déterminer si le phénotype émergent de lésion hépatique observé à 4 semaines s'aggrave avec le temps, des souris OGT^{INDLKO} ont été étudiées 8 semaines après la délétion de l'OGT hépatocytaire. Comme déjà observé pour le modèle de délétion constitutif, le poids du foie a augmenté de manière significative chez les souris OGT^{INDLKO} par rapport aux souris OGT^{LWT} (**Figure 40A**). Nous avons confirmé une réduction de l'expression de l'Ogt et de l'Oga dans le foie des souris OGT^{INDKO} par rapport aux témoins (**Figure 40B**). Une augmentation significative des marqueurs de fibrose (α SMA, Col3a1, Col6a1) a été observée (**Figure 40I**), corroborant la coloration positive pour le Sirius Red et l'immunomarquage α SMA, révélant l'activation des fibroblastes et une fibrose hépatique avancée avec des nodules de régénération (**Figure 40E**). De plus, nous avons mis en évidence une augmentation des niveaux de CHOP dans le foie des souris OGT^{INDLKO} par rapport aux souris témoins (**Figure 40D**). La coloration HE a également révélé un phénotype de ballonnisation hépatocytaire et une altération de l'architecture hépatique chez les souris OGT^{INDLKO} (**Figure 40E**). En effet, les souris OGT^{INDLKO} ont une augmentation significative des concentrations circulantes d'ALAT, d'ASAT, de PAL et de LDH (**Figure 40H**). L'expression de marqueurs d'inflammation (*Tnf α* et *Mcp1*) et l'infiltration des macrophages hépatiques

sont également augmentées dans le foie des souris OGT^{INDLKO} par rapport aux souris OGT^{LWT} (**Figures 40E et 40G**). De plus, nous avons mesuré les marqueurs de stress oxydant par qPCR et nous avons mis en évidence une induction de ces gènes (*Nqo1*, *Nrf2*, *Gsta1*, *Gstm3*) dans le foie des souris OGT^{INDLKO} (**Figure 40F**). Une immunoloration positive pour Ki67 a été observée dans des coupes de foie de souris OGT^{INDLKO} (**Figure 41C**), suggérant une activation des voies de prolifération. En effet, l'expression des marqueurs de prolifération (*Ki67*, *CycA2*, *CycB1*, *CycD1*) est significativement induite dans le foie des souris OGT^{INDLKO} par rapport aux souris OGT^{LWT} (**Figure 41A**). Enfin, nous avons examiné les marqueurs d'identité cellulaire dans le foie de souris OGT^{INDLKO} (**Figure 41B**). Une augmentation significative de l'expression des cellules progénitrices et des marqueurs de cholangiocytes, Ck7 et Ck19 ainsi qu'une réduction de l'expression de HNF4 α -P1, marqueur d'identité hépatocytaire, a été observée dans les foies des souris OGT^{INDLKO} par rapport aux souris OGT^{LWT} 8 semaines après la délétion de l'OGT (**Figure 41B**). Des coupes de foie immunomarquées avec CK7 et SOX9 ont permis de confirmer une réaction ductulaire diffuse dans le foie des souris OGT^{INDLKO} (**Figure 41C**), comme déjà observé dans le modèle de délétion constitutif.

Fait intéressant, l'immunomarquage OGT a montré que les hépatocytes des nodules de régénération hépatique re-expriment l'OGT (principalement au niveau nucléaire) suggérant une contre-sélection des cellules déficientes en OGT lors de la régénération du foie (Baker et al., 2020) (**Figure 41D**). Lorsque nous avons comparé l'expression de l'OGT en qPCR à 2, 4 et 8 semaines post-délétion, nous avons observé que la diminution de l'expression hépatocytaire de l'OGT est maximale à 4 semaines et qu'à partir de 8 semaines l'expression de l'OGT est restaurée (**Figure 41E**). Cette re-expression a été confirmée western blot (**Figure 41F**).

L'ensemble de ces résultats révèlent que la délétion hépatique de l'OGT à l'âge adulte induit un stress oxydant, un stress du RE, de l'inflammation hépatique et une fibrose avancée avec des nodules de régénération 8 semaines après l'induction de la délétion hépatocytaire de l'OGT. Fait intéressant, nous avons confirmé une contre-sélection des cellules déficientes en OGT, comme déjà observé dans le modèle de délétion constitutive, conduisant à une ré-augmentation de l'expression de l'OGT dans ces nodules.

Comme déjà observé dans le modèle de délétion constitutive de l'*Ogt*, nous avons confirmé, chez les souris OGT^{INDLKO} une réduction de l'expression de FXR et de ses gènes cibles (*Cyp2c70*, *Cyp8a1* et *Cyp7a1*, *Lxr*, *Shp*) (**Figure 42**) confirmant une dérégulation de la signalisation FXR en cas d'inactivation de l'*Ogt* hépatocytaire.

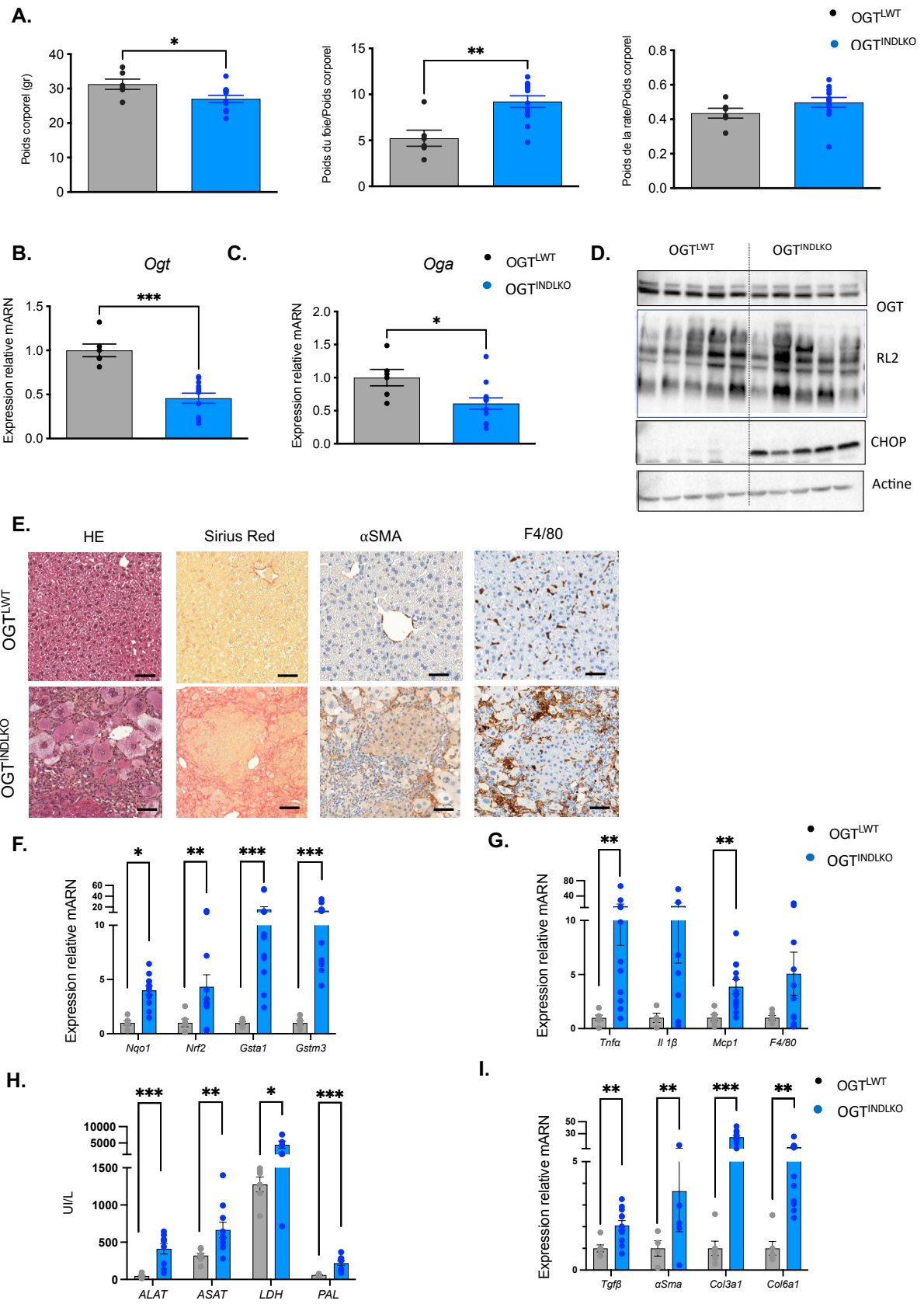


Figure 40. L'inhibition de l'OGT hépatocytaire à l'âge adulte entraîne un stress oxydant, un stress du RE, des lésions hépatiques et une fibrose avancée avec des nodules de régénération hépatique à 8 semaines

A. Poids corporel (g), poids du foie et de la rate. **B.** Expression relative de l'Ogt normalisée par rapport à l'expression de la GAPDH. **C.** Expression relative de l'Oga normalisée par rapport à l'expression de la GAPDH. **D.** Analyse par Western blot des niveaux d'OGT, protéine O-GlcNAcylée (RL2), CHOP dans des lysats totaux de foie. L'actine a été utilisée comme contrôle de charge. Cinq échantillons représentatifs sont présentés par condition. **E.** Coupes de foie colorées par HE, Sirius Red, α SMA, F4/80. Barres d'échelle = 100 μ m et =200 μ m pour la coloration Sirius Red. **F.** Niveaux relatifs d'expression des marqueurs de stress oxydant normalisés par rapport à l'expression de la GAPDH. **G.** Niveaux relatifs d'expression des marqueurs d'inflammation normalisés par rapport à l'expression de la GAPDH. **H.** Taux sériques d'alanine aminotransférase (ALAT), d'aspartate aminotransférase (ASAT), de lactate déshydrogénase (LDH) et de phosphatase alcaline (PAL). **I.** Niveaux relatifs d'expression des marqueurs de fibrose normalisés par rapport à l'expression de la GAPDH. Les données sont présentées sous forme de moyenne \pm SEM de 4 à 8 souris mâles ou femelles. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ par test t de Student non apparié (Mann-Whitney).

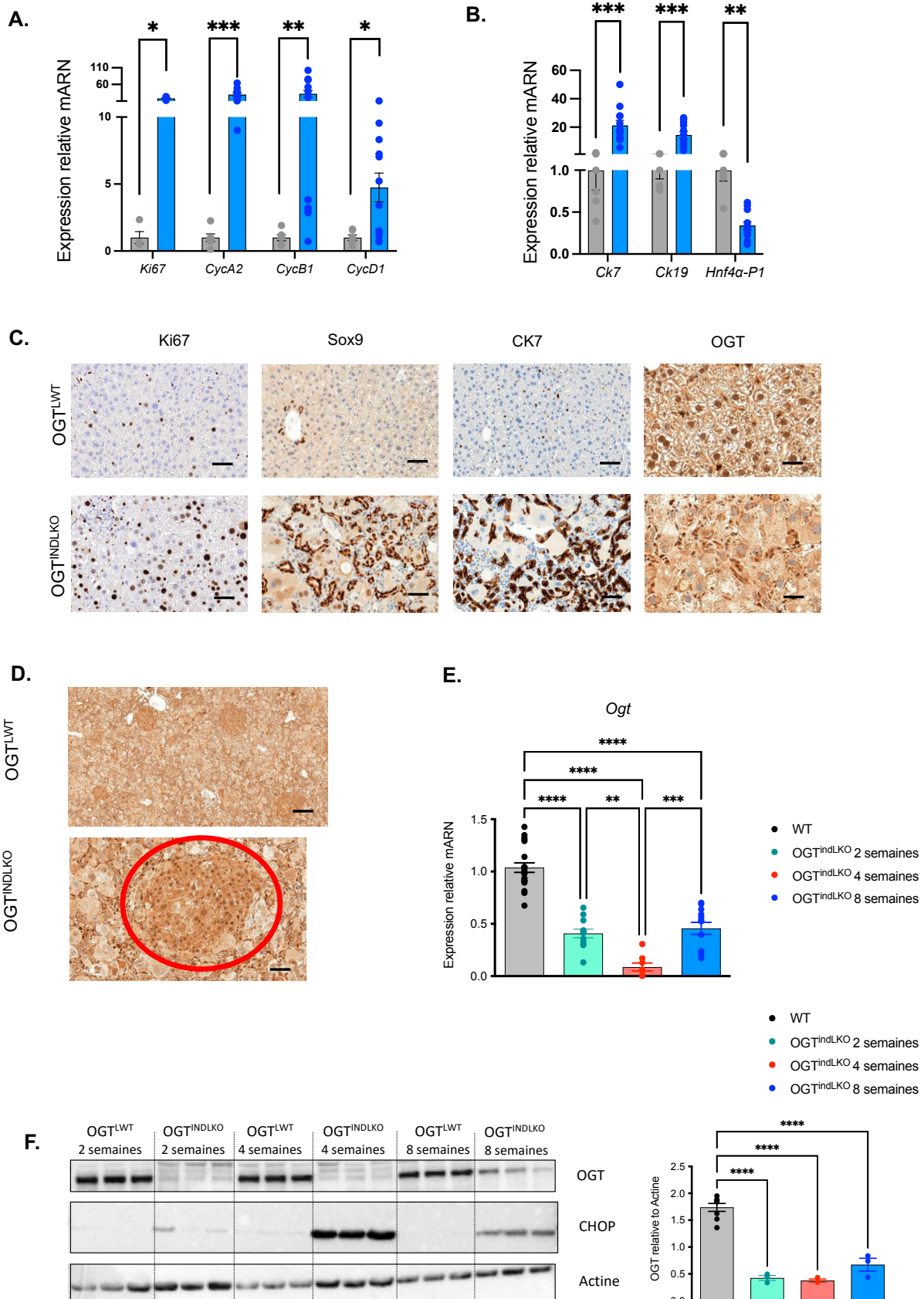


Figure 41. Les souris avec une délétion inducible de l'OGT hépatocytaire ont une réaction ductulaire diffuse à 8 semaines

A. Niveaux relatifs d'expression des marqueurs de prolifération normalisés par rapport à l'expression de la GAPDH. **B.** Expression relative des marqueurs d'identité cellulaire normalisés par rapport à l'expression de la GAPDH. **C.** Coupes de foie immunomarquées avec les anticorps Ki67, Sox9, Ck7, OGT. Barres d'échelle = 100 μ m. **D.** Coupes de foie immunomarquées avec l'anticorps OGT. Barres d'échelle = 200 μ m. Le zoom détaillé est affiché dans la section inférieure avec une barre d'échelle = 50 μ m. **E.** Expression relative de l'Ogt à 2, 4 et 8 semaines normalisée par rapport à l'expression de la GAPDH. **F.** Analyse par Western blot de l'OGT et de CHOP à 2, 4 et 8 semaines. Trois échantillons représentatifs sont présentés. L'actine a été utilisée pour normaliser. Les données sont représentées par la moyenne \pm SEM de 4 à 8 souris mâles et femelles. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $P < 0,001$, ***** $P < 0,0001$ par test t de Student non apparié (Mann-Whitney).

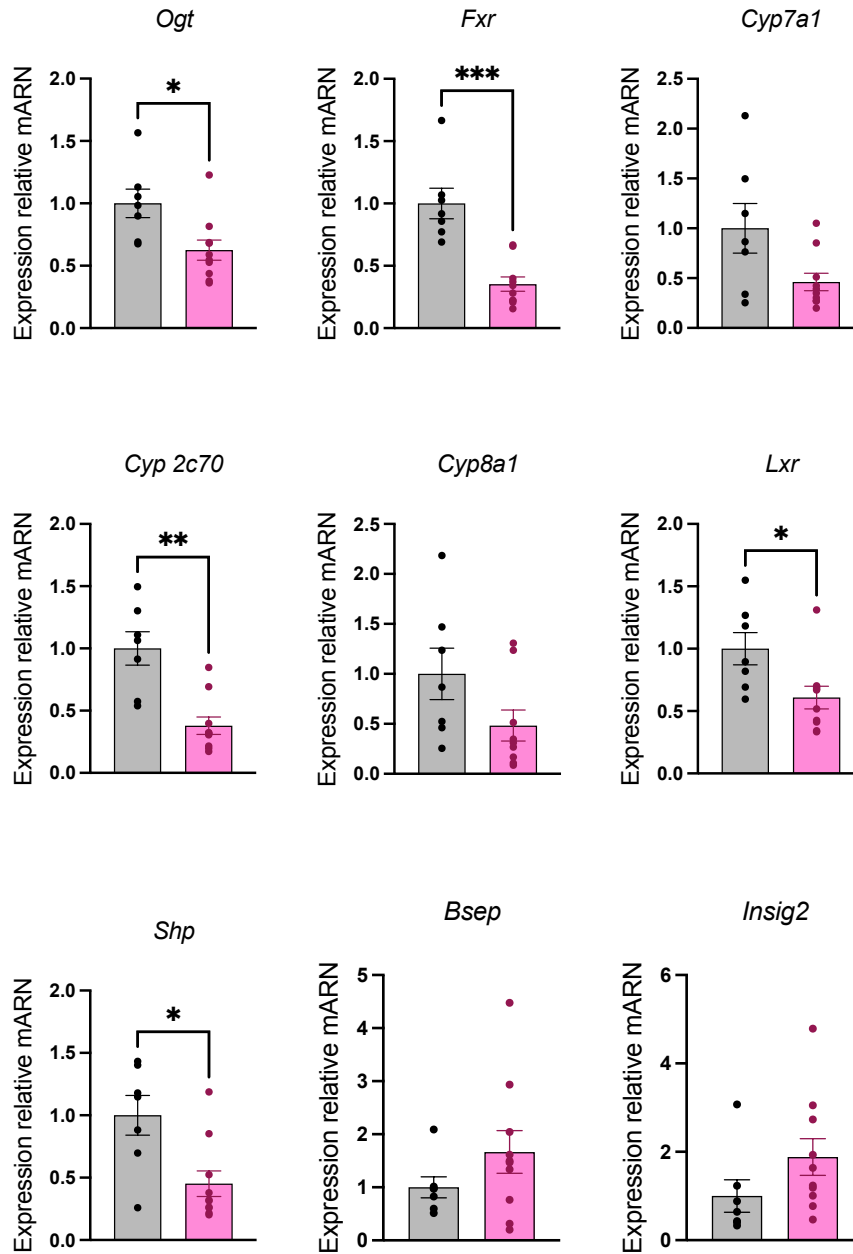


Figure 42. Les souris avec une délétion inducible de l'OGT hépatocytaire ont une réduction de l'expression de Fxr et de ses cibles 8 semaines après l'induction de la délétion.

Niveaux d'expression relatifs de Fxr et de ses cibles normalisés par rapport à l'expression de la GAPDH. Les données sont représentées par la moyenne \pm SEM de 7 à 10 souris femelles. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ par test t de Student non apparié (Mann-Whitney).

Conclusions

Notre étude montre que le rôle de l'OGT dans le maintien de l'homéostasie hépatique est indépendant de l'âge de la souris. En effet, en induisant une délétion de l'OGT hépatocytaire à l'âge adulte nous reproduisons le même phénotype hépatique du modèle murin avec la délétion constitutive de l'OGT hépatocytaire. Ce modèle nous a permis d'identifier l'inflammation hépatique et le stress oxydant comme des altérations très précoces dans le développement du phénotype hépatique délétère. Enfin, l'analyse par RNASeq a mis en évidence une augmentation significative des voies de réparation de l'ADN dans le foie des souris OGT^{INDLKO} après 2 semaines de la délétion de l'OGT hépatocytaire et, au contraire, une réduction significative des gènes impliqués dans le métabolisme des acides biliaires. Ces données pourraient nous aider dans la compréhension des mécanismes sous-jacents conduisant aux altérations hépatiques importantes observées chez les souris invalidées pour l'OGT hépatocytaire.

Objectif n°3 : Analyse de l'expression de l'OGT et des niveaux de O-GlcNAcylation dans le foie des patients atteints de MASLD

Matériels et méthodes

Cohortes de patients

Des échantillons de foie ont été sélectionnés à partir de deux cohortes de patients, une cohorte provenant du CHU de Lille et une cohorte provenant du CHU de Toulouse.

- Cohorte ABOS-CHU de Lille

La cohorte Lilloise (Cohorte de l'Atlas Biologique de l'Obésité Sévère (ABOS)) est composée de patients caucasiens français avec une obésité morbide ayant subi une chirurgie bariatrique (ClinicalGov NCT01129297). Tous les patients ont eu une évaluation préopératoire (antécédents médicaux et examen physique) et étaient exclus si une ou des conditions augmentaient les risques de chirurgie abdominale. Trois groupes ont été définis et classés comme témoins maigres (pas de stéatose), sujets obèses avec stéatose hépatique mais inflammation limitée ($NAS \leq 3$) et sujets obèses avec MASH ($NAS \geq 5$).

- Cohorte patients MASH-CHU Toulouse

Des échantillons de foie ont été sélectionnés à partir d'une cohorte de patients (hommes et femmes) ayant une MASLD confirmée par biopsie hépatique dans le service d'hépatologie du Centre Hospitalier Universitaire de Toulouse (Smati et al., 2022). Tous les patients ont donné leur consentement écrit et les échantillons de foie ont été congelés et conservés à -80°C au Centre de Ressources Biologiques du CHU de Toulouse. Pour l'étude, les patients répondant aux critères suivants ont été sélectionnés : âge supérieur à 18 ans, consentement éclairé signé, biopsie hépatique (PBH) réalisée par voie trans-jugulaire. Les patientes présentant un ou plusieurs des critères suivants ont été exclues de l'analyse: femmes hystérectomisées avant 50 ans avec statut hormonal inconnu, syndrome de Turner, traitements hormonaux autres que pilule contraceptive et traitement hormonal substitutif, traitements immunosuppresseurs, traitements pouvant induire une stéatose hépatique (méthotrexate, tamoxifène, corticoïdes, amiodarone), patient sous tutelle ou curatelle, et biopsie hépatique réalisée lors d'une chirurgie bariatrique. Aucune femme incluse dans l'analyse n'était sous contraceptifs hormonaux ou sous traitement de la ménopause. Les 80 biopsies provenaient de 48 hommes et 32 femmes (78 % étaient

ménopausées). Cette cohorte a été approuvée par l'Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé (ANSM) et le comité d'éthique local en 2015 (ClinicalTrial.gov : NCT02390232), et par le ministre de l'Enseignement supérieur, de la Recherche et de l'Innovation en 2017 (DC- 2017-2984).

Scores histologiques de la MASLD

Les scores NAS (*NAFLD activity score*) et SAF (*steatosis, activity, fibrosis*) ont été utilisés pour la classification histologique de la MASLD.

Le NAS est défini comme le résumé non pondéré des scores pour le pourcentage de stéatose (0 : 0–5 % ; 1 : 5–30 % ; 2 : 30–66 % ; 3 : 66–90 %), le ballonnement hépatocytaire (0 : aucun ; 1 : quelques cellules ballonnées ; 2 : nombreuses cellules/ballonement important) et inflammation lobulaire (0 : aucun foyer ; 1 : <2 foyers/200 × ; 2 : 2–4 foyers/200 × ; 3 : > 4 foyers/200 ×) allant donc de 0 à 8. Un score NAS supérieur ou égal à 5 était corrélé à la MASH et un score NAS inférieur à 3 était considéré comme l'absence de MASH (Kleiner et al. 2005). Les stades de fibrose ont également été déterminés séparément du score NAS (F0 : aucun ; F1 : périsinusoïdal ou périportal ; F1a : léger, zone 3, périsinusoïdal ; F1b : modéré, zone 3, périsinusoïdal ; F1c : portail/périportal ; F2 : périsinusoïdal et portail/ périportale ; F3 : fibrose pontante ; F4 : cirrhose).

Le SAF est défini comme le résumé non pondéré des scores pour le pourcentage de stéatose (0 : 0–5 % ; 1 : 5–33 % ; 2 : 34–66 % ; 3 : 67–100 %), l'activité : stéatose (0-3), + Ballonisation (0-2) + inflammation (0-3) et la fibrose (0 : normal, 1 : central (1a,B), portal (1c), 2 : central + portal, 3 : septa fibreux, 4 : cirrhose) (Bedossa et al. 2012).

Les corrélations entre l'expression de l'OGT hépatocytaire et les transaminases ont été réalisées à l'aide du logiciel SPSS version 22.

Analyse de corrélation et des fonctions des gènes dont l'expression hépatique est associée à celle de l'OGT chez les patients des deux sexes

Les méthodes et ressources ont été décrites précédemment (Smati et al., 2022). Des matrices de corrélation ont été créées avec les niveaux d'expression de l'ensemble des gènes exprimés. L'expression des gènes est considérée comme significativement corrélée quand le coefficient de corrélation est supérieur à 0,8 et que la p-value est

<0.05. Ces corrélations entre gènes sont utilisées pour créer des réseaux de corrélation. Le réseau des 50 gènes les plus corrélés avec un gène, ici le gène codant pour l'OGT, est mis en forme sous forme de cercle. Les noms en mauve autour du cercle indiquent une corrélation significative de l'expression du gène à celle de l'OGT. Au cœur du cercle, les lignes bleues entre deux gènes représentent une corrélation négative entre les niveaux d'expression de deux gènes. Les lignes rouges entre deux gènes représentent une corrélation positive entre les niveaux d'expression de deux gènes.

La liste des gènes dont l'expression est significativement corrélée avec celle de l'OGT (adj. Pval<0,05), a été utilisée pour une analyse des principales fonctions représentées parmi ces gènes en utilisant l'application Metascape (Zhou et al.,2019).

Résultats

Les caractéristiques des patients de la cohorte ABOS sont résumées dans le tableau de la **Figure 43A**. Par rapport aux contrôles, les patients ayant une MASH avaient un IMC plus élevé ($44,7 \pm 4,35$ vs $23,8 \pm 1,78$, $p < 0,05$), plus fréquemment une insulino-résistance ou un diabète de type 2 mal contrôlé (HbA1c $9,58 \pm 0,42$ vs $5,51 \pm 0,73$, $p < 0,05$) et des transaminases plus élevées (ALAT $55,8 \pm 10,11$ vs $22,1 \pm 5,17$, $p < 0,005$ et ASAT $112,2 \pm 8,77$ vs $23,4 \pm 12,69$, $p < 0,05$). Nous avons observé que l'expression de l'OGT hépatique avait tendance à être augmentée chez les patients ayant une stéatose et une MASH (**Figure 43B, 43C et 43D**). Comme attendu, nous avons observé une tendance à l'augmentation des marqueurs d'inflammation (*Mcp1*, *IL1 β* , *Tnf α* et *F4/80*) (**Figure 43E**) chez les patients ayant une MASH par rapport aux patients contrôles. De plus, nous avons mis en évidence une corrélation directe entre le niveau d'expression de l'OGT et les concentrations sériques de transaminases (**Figure 43F**). Enfin, nous avons observé une tendance à l'augmentation de l'expression de l'OGT parallèlement à l'augmentation de la ballonisation hépatocytaire, l'inflammation et la fibrose hépatique (**Figure 43G**).

Les caractéristiques des patients de la cohorte Toulousienne sont résumées dans le tableau de la **Figure 44A**. En fonction du sexe, il n'y avait pas de différence significative en termes d'âge, de facteur de risque du syndrome métabolique, de niveaux sériques des transaminases, de caractéristiques histologiques hépatique. Les hommes avaient un IMC plus élevé par rapport aux femmes ($38,6 \pm 8,2$ vs $32,2 \pm 5,8$, $p < 0,001$).

Le profilage de l'expression génique dans la MASLD met en évidence un dimorphisme sexuel du réseau de gènes dont l'expression hépatique est corrélée à celle de l'*Ogt* (**Figure 44B**). En effet, à l'analyse des gènes montrant une expression d'ARNm fortement corrélée avec l'ARNm de l'*Ogt* chez les hommes et les femmes (valeur p ajustée $< 0,05$) (**Figure 44C**) nous avons observé des voies communes aux deux sexes (métabolisme de l'ARN, réponse cellulaire au stress, traduction, réponse aux infections virales, biogénèse des complexes des ribonucléoprotéines etc) et des voies spécifiques aux hommes (voie du VEGF, signalisation AKT dans le cancer) et aux

femmes (voie Rho-Kinase, assemblage du complexe mitochondrial IV et organisation mitochondriale).

Parmi les gènes dont l'expression hépatique est corrélée à celle de l'OGT communs aux hommes et aux femmes, nous avons mis en évidence le gène SENP 7 (*sentrin/SUMO-specific protease 7*). SENP est un activateur de cGAS (DNA-sensing receptor cyclic GMP–AMP synthase) (Cui et al., 2017). La voie cGAS-STING (DNA-sensing receptor cyclic GMP–AMP synthase (cGAS) and downstream signalling effector stimulator of interferon genes (STING)) permet l'identification des acides nucléiques étrangers ou endommagé afin d'activer les voies de signalisation immunitaire pour la défense de l'hôte (Motwani et al., 2019). Un rôle causal pour le STING dans le développement de la MASH a été démontrée. L'activation de STING dans les macrophages hépatiques conduit à la production de cytokines pro-inflammatoires, conduisant à une inflammation hépatique et des lésions hépatocellulaires (Luo et al., 2018).

Un autre gène dont l'expression est corrélée à celle de l'OGT chez les femmes et chez les hommes est EYA1 (*eyes absent 1*), qui est un coactivateur transcriptionnel de SIX1 (*sine oculis homeobox homolog 1*) (Ruf et al., 2004). Récemment il a été rapporté que SIX1 joue un rôle dans la pathogènes de la MASLD chez la souris. Les auteurs ont démontré que dans un modèle murin de MASLD induit avec un régime MCD (*methionine-choline deficient diet*) ou HFHC (*high fat-high carbohydrates*), SIX1 active directement l'expression de LXR α et LXR β , induisant ainsi une lipogénèse de novo. De plus, ils ont décrit un rôle critique de SIX1 dans la régulation de la voie TGF- β , en augmentant les niveaux des récepteurs du TGF- β de type I et II (TGF β RI/TGF β RII) dans les cellules étoilées hépatiques. Enfin, ils ont constaté qu'une délétion de SIX1 spécifique au foie pouvait améliorer la pathogénèse de la MASLD chez la souris (Gao et al., 2023).

En analysant les voies corrélées à l'expression de l'OGT sélectivement chez l'homme, nous avons mis en évidence la voie de VEGF (*vascular endothelial growth factor*) et celle de PI3K/AKT (*phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/protein kinase B (AKT)*) .

L'induction de l'angiogénèse est un événement très précoce dans la MASLD. La stéatose, en augmentant le métabolisme des acides gras, augmente la consommation d'oxygène, générant un micro-environnement pro-angiogénique hypoxique. La

stéatose provoque également une pression mécanique sur les sinusoides, ce qui aggrave encore le manque d'apport d'oxygène en favorisant un micro-environnement pro-angiogénique (Farrel et al., 2008).

Le foie des patients atteints de MASLD présente une expression accrue du marqueur endothélial, le vWF (von Willebrand Factor), en particulier chez les patients atteints de fibrose avancée (Lemoine et al., 2015). De plus, il a été décrit une corrélation entre l'expression du vWF et l'expression du collagène XV, un marqueur spécifique des myofibroblastes portaux, qui ont des propriétés pro-angiogéniques, notamment en sécrétant des vésicules extracellulaires contenant du VEGF (Lemoine et al., 2015).

Une autre voie corrélée à l'expression de l'OGT chez l'homme est la voie PI3K/AKT qui joue un rôle important dans le cycle cellulaire, la croissance et la prolifération. L'augmentation de l'activation de cette voie est présente dans les tumeurs malignes humaines et a été impliquée dans la progression du cancer (Yang et al., 2019). La dérégulation de la voie PI3K/AKT dans les hépatocytes est un événement moléculaire courant associé à des dysfonctionnements métaboliques chez l'homme, notamment l'obésité, le syndrome métabolique et la MASLD (Matsuda et al., 2013).

En analysant les voies corrélées à l'expression de l'OGT sélectivement chez la femme, nous avons mis en évidence la voie Rho-kinase (*Rho-associated coiled-coil-containing kinase*) et les voies d'assemblage du complexe IV mitochondrial et de l'organisation mitochondriale.

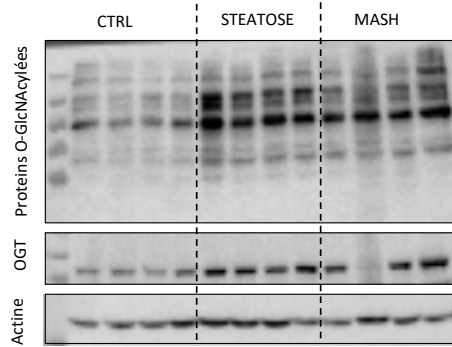
Des données récentes ont souligné l'importance de l'action de la Rho-kinase dans le maintien de l'homéostasie lipidique hépatique. En particulier, le blocage pharmacologique de la Rho-kinase dans les hépatocytes ou les cellules étoilées hépatiques empêche la progression des maladies hépatiques telles que la MASLD et la fibrose. De plus, les souris invalidées pour la Rho-Kinase hépatique sont protégées contre la stéatose induite par l'obésité (Sousa-Lima et al, 2021).

Enfin l'expression de l'OGT est corrélée, chez la femme, aux voies impliquées dans l'homéostasie mitochondriale. Le stress oxydant est le principal mécanisme de lésion hépatocellulaire, d'inflammation hépatique et de fibrose dans la MASLD (Mansouri et al., 2018). Le dysfonctionnement mitochondrial est le principal contributeur du stress oxydant et, par conséquent, les mitochondries jouent un rôle essentiel dans la pathogenèse de la MASLD.

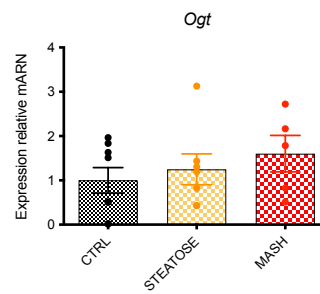
A.

| | CTRL | STEATOSE | MASH |
|-------------------------------|--------------|--------------|---------------|
| Age (ans) | 47,3 ± 12,87 | 38,1 ± 10,04 | 53,4 ± 8,94 |
| IMC (Kg/m ²) | 23,8 ± 1,78 | 48,5 ± 5,75* | 44,7 ± 4,35* |
| Glycémie à jeun (mmol/L) | 4,4 ± 0,61 | 4,7 ± 0,26 | 10,8 ± 2,97* |
| Insulinémie à jeun (UI/L) | 5,9 ± 1,68 | 12,6 ± 5,04* | 50,8 ± 10,72* |
| HbA1c (%) | 5,51 ± 0,73 | 5,40 ± 0,12 | 9,58 ± 0,42* |
| HOM-IR | 0,7 ± 0,33 | 1,5 ± 0,63 | 6,6 ± 1,43* |
| ALAT (UI/L) | 22,1 ± 5,17 | 28,6 ± 3,55 | 55,8 ± 10,11* |
| ASAT (UI/L) | 23,4 ± 12,69 | 32,2 ± 18,56 | 112,2 ± 8,77* |
| GGT (UI/L) | 48,1 ± 5,04 | 25,4 ± 7,14 | 98,8 ± 10,06* |
| Triglycérides (mg/dl) | 1,2 ± 0,40 | 1,69 ± 0,65 | 2,43 ± 1,03* |
| % d'hépatocytes avec stéatose | 4,4 ± 0,61 | 62 ± 9,18* | 65 ± 16,74* |
| Score NAS | 0,4 ± 0,53 | 2,5 ± 0,11* | 6,4 ± 0,32* |

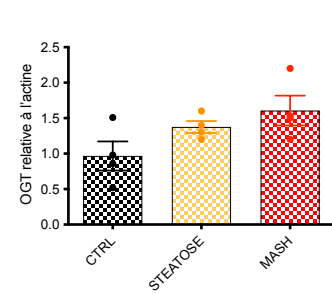
B.



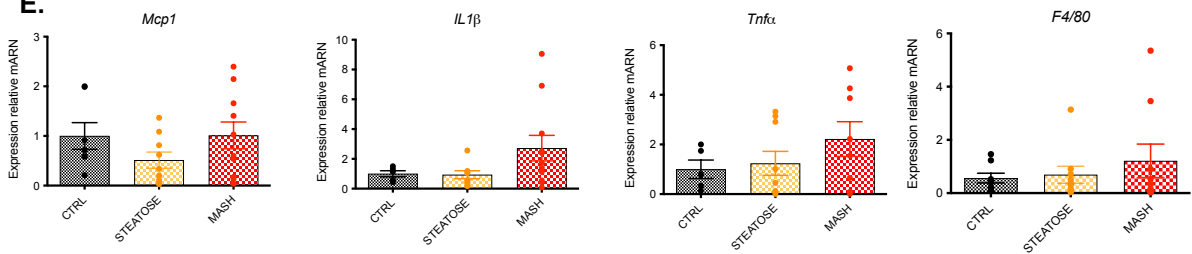
C.



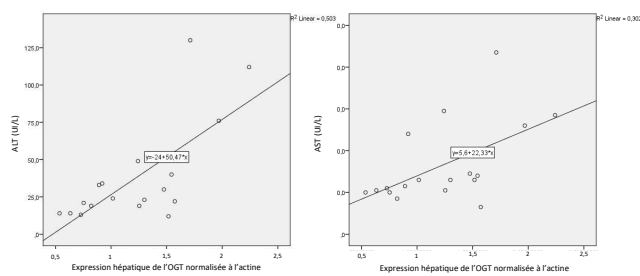
D.



E.



F.



G.

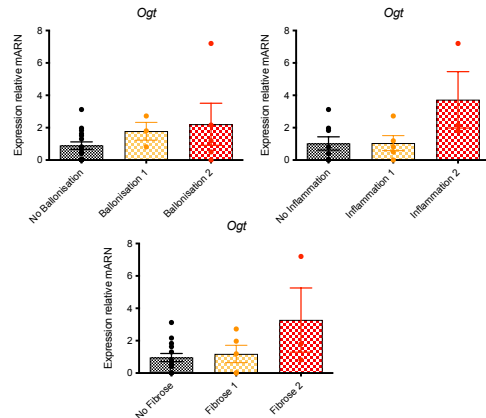


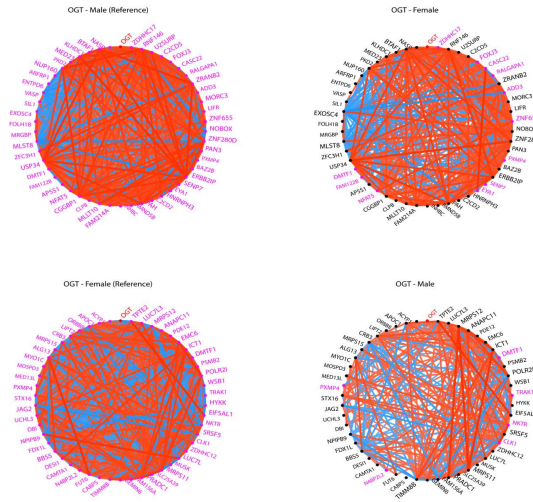
Figure 43 : L'expression de l'OGT et la O-GlcNAcylation sont augmentées dans la MASLD

A. Caractéristiques cliniques et biochimiques des patients contrôles, avec une stéatose et une MASH. (N=10 par groupe). Pour l'analyse statistique nous avons utilisé le test Anova suivi par le test de Bonferroni. * $p < 0,05$. **B. D.** Analyse par Western blot de l'OGT et des protéines O-GlcNAcylées dans le foie des patients contrôles, des patients ayant une stéatose et des patients ayant une MASH. Quatre échantillons représentatifs sont présentés. L'actine a été utilisée pour normaliser. **C.** Expression de l'Ogt normalisée au h18s. **E.** Niveaux d'expression relatifs des gènes de l'inflammation normalisés par rapport à l'expression de la GAPDH. **F.** Corrélation entre l'expression de l'OGT et les transaminases. **G.** Niveau d'expression de l'OGT hépatique en fonction de la ballonisation, l'inflammation et la fibrose hépatique.

A.

| | Hommes (48) | Femmes (32) | p |
|------------------------------------|-------------|-------------|--------|
| Age (ans) | 58,1 ± 10,4 | 56,1 ± 11,9 | 0,533 |
| IMC (Kg/m ²) | 32,2 ± 5,8 | 38,6 ± 8,2 | <0,001 |
| HbA1c (%) | 7,0 ± 1,2 | 6,6 ± 1,3 | 0,242 |
| Dyslipidémie | 24 (50%) | 13 (41,9%) | 0,500 |
| Hypertension artérielle | 33 (68,8%) | 19 (59,4%) | 0,475 |
| Diabète de type 2 | 31 (64,6%) | 25 (78,1%) | 0,223 |
| ALAT (UI/L) | 60,7 ± 33,0 | 49,0 ± 27,7 | 0,132 |
| ASAT (UI/L) | 38,0 ± 21,1 | 36,7 ± 23,2 | 0,778 |
| Stéatose | 1,7 ± 0,8 | 2,0 ± 0,8 | 0,208 |
| Ballonisation (Score SAF) | 1,0 ± 0,6 | 1,3 ± 0,6 | 0,132 |
| Inflammation lobulaire (Score SAF) | 0,9 ± 0,6 | 1,1 ± 0,5 | 0,338 |
| Score de fibrose | 2,2 ± 1,2 | 2,1 ± 1,0 | 0,547 |
| Score NAS | 3,7 ± 1,7 | 4,3 ± 1,3 | 0,074 |

B.



C.

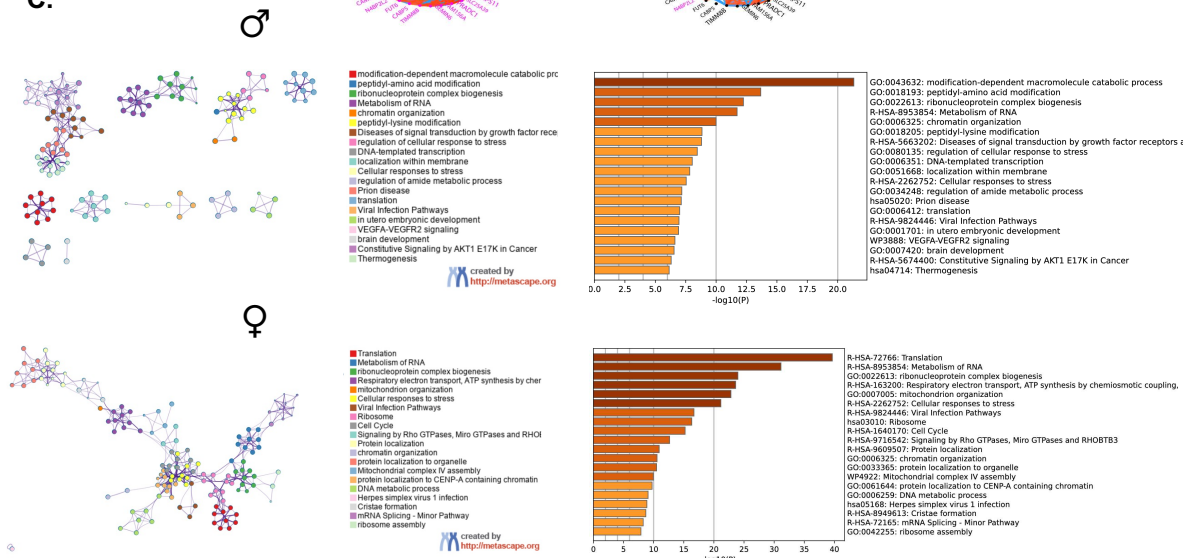


Figure 44 : Dimorphisme sexuel du réseau de corrélation et des fonctions des gènes dont l'expression hépatique est corrélée à celle de l'Ogt

A. Caractéristiques des patients NAFLD selon le sexe. Moyenne \pm écart type des caractéristiques cliniques chez les hommes et les femmes. Pour l'analyse statistique nous avons utilisé le test de Mann Whitney IMC : Indice de Masse Corporelle ; AST : Aspartate AminoTransférase ; ALT : Alanine AminoTransférase ; HbA1c : Hémoglobine Glyquée.

B. Réseau de référence chez l'homme (2 cercles du haut) : le réseau des 50 gènes dont l'expression (ARNm) est la plus corrélée à l'expression de l'OGT hépatique sert de référence chez l'homme (sur la droite). Si le nom du gène autour du cercle est indiqué en mauve c'est que son expression significativement corrélée à celle de l'OGT ($p < 0.05$). Les traits rouge et bleu indiquent des corrélation significatives, respectivement positive ou négative, entre les niveaux d'expression des gènes qui figurent autour du cercle. Le réseau à gauche présente les corrélations entre le niveau d'expression de l'OGT et ces mêmes 50 gènes chez les femmes. Le nom de gène en noir indique que la corrélation n'est pas significative.

Réseau de référence chez la femme (2 cercles du bas) : le réseau des 50 gènes dont l'expression (ARNm) est la plus corrélée à l'expression de l'OGT hépatique sert de référence chez la femme (sur la droite). Si le nom du gène autour du cercle est indiqué en mauve c'est que son expression significativement corrélée à celle de l'OGT ($p < 0.05$). Les traits rouge et bleu indiquent des corrélation significatives, respectivement positive ou négative, entre les niveaux d'expression des gènes qui figurent autour du cercle. Le réseau à gauche présente les corrélations entre le niveau d'expression de l'OGT et ces mêmes 50 gènes chez les hommes. Le nom des gènes en noir indique que la corrélation n'est pas significative.

C. La liste des gènes dont l'expression est significativement corrélée avec celle de l'OGT (adj. $P_{val} < 0,05$), a été utilisée pour une analyse des principales fonctions représentées parmi ces gènes en utilisant l'application Metascape (Zhou et al., 2019) chez les hommes (partie haute) et chez les femmes (partie basse).

Ces données suggèrent que l'expression de l'OGT est corrélée à des voies impliquées dans la pathogénèse de la MASLD, notamment le stress oxydant, l'inflammation et la fibrose hépatique. Si certaines voies corrélées à l'OGT sont communes aux hommes et aux femmes, d'autres sont spécifiques de chaque sexe, confirmant un dimorphisme sexuel de cette pathologie (Lefebvre et Staels, 2021, Chia Eng et al., 2023).

Conclusions

Nos données préliminaires suggèrent que la O-GlcNAcylation est impliquée dans la phytopathologie de la MASLD. Éclaircir les mécanismes moléculaires de la O-GlcNAcylation dans l'initiation et la progression de la MASH pourrait fournir des cibles thérapeutiques dans la prise en charge de cette pathologie. De plus, l'identification de cibles thérapeutiques spécifiques aux hommes et aux femmes pourrait permettre le développement d'une « médecine personnalisée ».

Discussion

Étant donné que l'étude de la fonction de l'OGT chez les souris globalement invalidées pour l'OGT a été limitée par son phénotype de létalité embryonnaire (Shafi et al., 2000), nous avons généré des souris spécifiquement invalidées pour l'OGT dans l'hépatocyte (deux modèles : un modèle constitutif (OGT^{LKO}) et un modèle inductible (OGT^{INDLKO}), pour mieux comprendre le rôle de la O-GlcNAcylation et de l'OGT dans l'homéostasie du foie.

- *Analyse du modèle constitutif de délétion de l'OGT hépatocytaire et prévention du phénotype hépatique avec une régime cétogénique*

Nous avons tout d'abord caractérisé la délétion constitutive de l'OGT et observé des signes clairs de lésions hépatiques, détectables dès l'âge de 2 semaines, avec une augmentation significative des marqueurs d'inflammation et de stress oxydant. Il est important de noter que des expériences sur des hépatocytes isolés à partir des foies des souris OGT^{LKO} en culture ont révélé un stress du RE et un stress oxydant, ce dernier étant mis en évidence par une diminution significative du rapport GSH / GSSH, une production de ROS ainsi qu'une augmentation de la peroxydation lipidique. De plus, le traitement des hépatocytes avec de la staurosporine, un inducteur de stress oxydant (Belmokhtar et al., 2001) et avec de la thapsigargine, un inducteur de stress du RE, a révélé une sensibilité plus élevée aux inducteurs de mort cellulaire pour les hépatocytes OGT^{LKO} par rapport aux hépatocytes OGT^{LWT}. Ces données, qui indiquent que la perte de O-GlcNAcylation rend les hépatocytes plus vulnérables à la mort cellulaire, sont cohérentes avec l'étude de Zhang et al. (Zang et al., 2019), qui a démontré que la suppression de l'OGT dans le foie entraîne une nécroptose importante et avec l'étude de Robarts et al. montrant que les souris déficientes en OGT hépatique présentaient une nécroptose et une apoptose accrues après une hépatectomie partielle (Robarts et al., 2022).

L'analyse au cours du temps des souris OGT^{LKO} a démontré le développement d'une dysmorphie hépatique et d'une splénomégalie 8 semaines après la naissance. La dysmorphie hépatique était associée à une fibrose, une inflammation hépatique et une

cholestase, caractéristiques couramment observées dans les modèles de ligature des voies biliaires une semaine après la ligature (Geerts et al., 2008). L'analyse histologique hépatique a révélé une activation des fibroblastes et une fibrose avancée avec le développement de nodules hépatiques de régénération. En corrélation avec ce phénotype sévère, les concentrations des cytokines circulantes ($TNF\alpha$, IL-2 et IL-6) et les marqueurs de lésions hépatiques (ALAT, ASAT, PAL et LDH) étaient également augmentés de manière significative à 8 semaines chez les souris OGT^{LKO}. Des modifications du profil d'identité cellulaire avec une réaction ductulaire ont également été observées, favorisant probablement la différenciation des hépatoblastes en cholangiocytes ou hépatocytes, événements clés dans les premières étapes de la régénération hépatique (Roskams et al., 2004). L'augmentation des marqueurs des cellules souches et des cholangiocytes a été validée par RT-qPCR. De plus, une réaction ductulaire a été mise en évidence lors de la coloration avec les anticorps SOX9 et Ck7/19 chez les souris OGT^{LKO}. La prolifération hépatique a également été confirmée par une augmentation de l'expression des marqueurs de prolifération (Cyclines A2, B1 et D1) ainsi que par une augmentation de l'immunomarquage hépatique au Ki67 dans le foie des souris OGT^{LKO} par rapport au souris OGT^{LWT}. Fait intéressant, nous avons observé que le nombre d'hépatocytes hautement polyploïdes était significativement augmenté dans le foie d'OGT^{LKO} dans des conditions de régime standard, parallèlement à leur état de stress oxydant. La polyplôïdisation est connue pour contribuer à la différenciation des tissus et, par conséquent, peut représenter un gain de fonction. Cependant, étant donné que le stress cellulaire favorise la polyplôïdisation et que les organes aux fonctions altérées contiennent des cellules polyploïdes, la polyplôïdisation est aussi largement considérée comme une lésion pathologique (Donne et al., 2020).

Étonnamment, nous avons observé une restauration de l'expression de l'OGT dans le foie des souris OGT^{LKO}, dès 8 semaines de vie. Nous avons émis l'hypothèse qu'un phénomène de contre-sélection pourrait expliquer la restauration de l'expression de l'OGT dans le foie de ces souris (Baker, 2020). Les hépatocytes déficients en OGT ont certainement des difficultés pour survivre dans un environnement de stress oxydant et d'inflammation et entrent dans le processus de mort cellulaire, tandis que, fait intéressant, les hépatocytes échappant au processus de recombinaison repeuplent le

foie avec des cellules exprimant de nouveau la protéine OGT. Plusieurs modèles de souris présentant un déficit d'expression hépatique de protéines impliquées dans les réactions de dommages à l'ADN, dans la régénération du foie ou dans les modulations épigénétique, telles que les protéine DDB1 (Yamaji et al., 2010), YAP (Zhang et al., 2010), ou EZH2 (Grindheim et al., 2019), ont montré un phénomène similaire. Fait intéressant, la restauration de l'expression de l'OGT n'a pas été observée dans le modèle précédemment publié par Zang et al. décrivant un modèle de souris invalidée pour l'OGT hépatocytaire (Zhang et al., 2019). A noter cependant, que l'expression hépatique de l'OGT chez ces souris n'a été documentée qu'à l'âge de 4 semaines.

Malgré la re-expression de l'OGT, le phénotype hépatique reste altéré jusqu'à l'âge de 12 mois, notamment avec une fibrose avancée et le développement de lésion hépatiques.

Vu l'importance de l'OGT dans la tumorigenèse hépatique et le fait que les souris femelles OGT^{LKO} développent des lésions hépatiques nous allons caractériser ces lésions sur le plan histologique et moléculaire. En effet le séquençage et le profilage de l'expression génique ont identifié des sous-classes transcriptomiques distinctes et des nombreuses altérations génétiques récurrentes dans les différentes lésions hépatocellulaires (Calderaro et al., 2019). Il serait intéressant d'évaluer dans les lésions hépatiques des souris OGT^{LKO} si la délétion de l'OGT a un impact sur des mutations génétiques particulières et/ou voies oncogènes.

Dans une tentative de diminuer l'apport en glucides chez les souris OGT^{LKO} et de réduire le stress oxydant associé à l'absence de l'OGT dans le foie, nous avons tout d'abord sevré les souris OGT^{LKO} sur un régime LCHF (21 % de glucides, 60 % de lipides, 19 % de protéines) dans lequel le pourcentage de glucides est réduit de 21% par rapport au régime standard (SD : 69 % de glucides, 4 % de lipides, 26 % de protéines). Ce changement nutritionnel a amélioré plusieurs paramètres, dont le stress oxydant, le stress du RE, mais aucune des autres altérations hépatiques telles que la ballonnisation hépatocytaire, l'infiltration hépatique de macrophages, la réaction ductulaire et la fibrose. Cependant, lorsque les concentrations de glucides dans l'alimentation ont été encore diminuées et limitées à 1 % dans le régime cétoène (KD : 1 % de glucides, 94 % de lipides, 5 % de protéines), une prévention complète du phénotype a pu être observée, y compris sur le stress oxydant, la polyploïdisation,

l'inflammation et, plus important encore, sur la prévention complète de la fibrose et des lésions hépatiques. Dans le cadre de ce changement nutritionnel, un rôle protecteur des lipides ne peut être exclu, et en fait la combinaison de la diminution de l'apport en glucides et de la modulation d'espèces lipidiques spécifiques pourrait avoir contribué aux effets bénéfiques observés. En effet, l'analyse lipidomique des expériences LCHF et KD a révélé que les souris OGT^{LKO} présentaient des espèces lipidiques bioactives spécifiques, notamment les céramides C24 : 0 et C24 : 1 élevées dans les conditions SD, espèces qui restent faibles dans des conditions KD, suggérant que ces espèces de céramides pourraient contribuer, au moins en partie, à l'effet protecteur du régime cétogène. De plus, les régimes LCHF et KD peuvent également différer dans leur capacité à produire des corps cétoniques, en particulier le β -hydroxybutyrate (β -OH), un métabolite de signalisation aux propriétés protectrices sur le stress oxydant (Rojas-Morales et al., 2020). Sur la base de ce concept, des études ont émis l'hypothèse que l'activation de la cétogenèse dans le foie pourrait potentiellement atténuer la progression de la MASH médiée par les ROS (Rojas-Morales et al., 2020).

Étant donné que le récepteur Farnesoid X (FXR) est un facteur de transcription contrôlé par la O-GlcNAcylation et que son activation a des effets anti-inflammatoires et anti-fibrotiques hépatiques chez les patients atteints de MASH (Arab et al., 2017), nous avons exploré si le phénotype hépatique des souris présentant une délétion de l'OGT hépatocytaire était associé à une dérégulation de la signalisation de FXR. De manière intéressante, les souris OGT^{LKO} présentent une expression diminuée de *Fxr* et de certains de ses gènes cibles dans le foie à 4 et 8 semaines de vie. Cette diminution est corrélée à une modification du profil des acides biliaires sériques, avec une réduction significative de la concentration sérique de l'UDCA et du LCA qui ont des effets protecteurs contre l'inflammation et la fibrose hépatique (Shao et al., 2022, Buko et al., 2011). De plus, nous avons observé, chez les souris invalidées pour l'OGT hépatocytaire, une augmentation de la concentration sérique du β MCA, qui est un puissant inhibiteur de *Fxr* (Sayin et al., 2013), ce qui pourrait participer à l'inhibition de la voie FXR dans notre modèle. Nous avons également observé une réduction de la voie de signalisation FXR dans le foie des souris OGT^{INDLKO}. Une réduction de la signalisation intestinale de FXR a été également décrite dans la MASH (Jiao et al., 2018) et dans d'autres hépatopathies chroniques (Albillons et al., 2020). Ainsi, le

traitement par un agoniste de FXR (acide obeticolique) a des effets anti-fibrotiques chez l'homme (Younoussi et al., 2019) et anti-inflammatoires au niveau hépatique (Xiong et al., 2017, Zhang et al., 2017).

Une étude plus détaillée des acides biliaires sériques et fécaux, de la signalisation de FXR au niveau intestinal et hépatique et des expériences *in vivo* et *in vitro* avec des agonistes de FXR seront nécessaires pour élucider si la réduction de la signalisation de FXR est la cause ou la conséquence du phénotype hépatique observé suite à la délétion de l'OGT hépatocytaire.

- *Analyse du modèle inductible de délétion de l'OGT hépatocytaire à l'âge adulte*

Nous avons observé que la délétion constitutive de l'OGT à un stade précoce du développement a des effets délétères hépatiques. Afin d'élucider les conséquences de la délétion de l'OGT indépendamment de tout facteurs confondant associés au développement post-natal, nous avons développé un modèle avec une délétion de l'OGT hépatocytaire à l'âge adulte. En analysant le modèle de délétion inductible de l'OGT hépatocytaire chez l'adulte, nous avons observé que l'instauration d'une inflammation hépatique est un événement précoce dans le développement du phénotype hépatique délétère. En effet, à partir de 2 semaines suivant l'induction de la délétion, nous avons mis en évidence des signes clairs de lésions hépatiques avec une augmentation des marqueurs d'inflammation. Nous avons donc réalisé une étude par cytométrie en flux pour mieux caractériser l'infiltrat inflammatoire hépatique. Dans le foie des souris OGT^{INDLKO}, nous avons observé une diminution des lymphocytes T CD4+, phénomène fréquent dans les maladies hépatiques chroniques (Sturm et al., 2010) et une diminution des cellules de Kupffer, associée à une augmentation des Ly6C^{hi} MoMac pro-inflammatoires, phénomène courant après la mort des hépatocytes (Graubardt et al., 2017). Enfin, nous avons mis en évidence une augmentation des deux sous-populations de cellules dendritiques conventionnelles et une tendance à l'augmentation des neutrophiles, phénomène retrouvé lors de l'inflammation tissulaire hépatique (Graubardt et al., 2017). Ces données, suggèrent que la perte de l'OGT et de la O-GlcNAcylation dans le foie à l'âge adulte induit aussi des lésions hépatiques avec une inflammation tissulaire importante.

Afin de mieux comprendre les mécanismes sous-jacents au phénotype hépatique observé chez les souris OGT^{INDLKO}, nous avons réalisé une étude RNA-Seq et nous avons observé que les souris OGT^{INDLKO} avaient, par rapport aux souris OGT^{LWT}, une augmentation significative des voies de réparation de l'ADN (réparation des mismatches, réparation par excision des nucléotides), du cycle cellulaire et de la sénescence cellulaire, ainsi qu'une réduction importante des gènes impliqués dans le métabolisme des acides biliaires, dans les voies métaboliques, dans le métabolisme des médicaments, dans la cascade du complément et de la coagulation et de l'autophagie. L'induction importante des voies de réparation de l'ADN pourrait être le mécanisme par lequel, malgré les importantes lésions hépatiques observées chez les souris OGT, l'animal est dans un bon état général. Le foie est un organe à faible taux de renouvellement cellulaire et dépend davantage des voies de réparation de l'ADN pour préserver les cellules (Vougioukalaki et al., 2022). La réduction de l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme des acides biliaires est en accord avec la réduction de la signalisation de FXR observée chez les souris OGT^{LKO} et OGT^{INDLKO}. Comme déjà mentionné, il faudra élucider si la baisse de la signalisation de FXR est la cause ou la conséquence des altérations hépatiques observées dans nos modèles.

- *Analyse de l'expression de l'OGT et des niveaux de O-GlcNAcylation chez les patients atteints de MASLD*

Compte tenu du rôle crucial de l'OGT dans l'homéostasie hépatique, nous avons voulu explorer si l'OGT et la O-GlcNAcylation participent à la physiopathologie des altérations histologiques observées dans la MASLD. Nos données préliminaires suggèrent que chez l'homme l'expression de l'OGT et la O-GlcNAcylation des protéines sont augmentées en cas de stéatose et de MASH. Nous avons analysé une cohorte de patients ayant une obésité morbide et ayant subi une chirurgie bariatrique (Cohorte ABOS, CHU de Lille). De façon intéressante nous avons observé une corrélation positive entre l'expression de l'*Ogt* et les niveaux d'inflammation et de ballonisation hépatique. Nous avons aussi mis en évidence une corrélation directe entre l'expression de l'OGT et les niveaux sériques des transaminases.

Des études antérieures ont indiqué que la O-GlcNAcylation est régulée positivement chez les souris MASH (Lee et al., 2019); cependant, la corrélation causale entre l'augmentation de la O-GlcNAcylation et la pathologie de la MASH n'est pas claire.

Un mécanisme possible pourrait être la signalisation de NF- κ B. NF- κ B est un facteur de transcription pro-inflammatoire activé par IRE1 α (*inositol requiring enzyme 1 α*) qui provoque une inflammation hépatique et favorise la MASH (Malhi et al., 2011, Lake et al. 2014). De plus, l'activité de NF- κ B est régulée par la O-GlcNAcylation (Yang et al. 2008), et l'augmentation de la O-GlcNAcylation régulée positivement l'activité de NF- κ B et augmente les lésions inflammatoires (Baudoin et Issad, 2014). Une autre étude a montré que les niveaux de la O-GlcNAcylation, de l'OGT et de GFAT (*glutamine: fructose-6-phosphate amidotransferase*) sont augmentés dans le foie de souris nourries avec un régime déficient en méthionine-choline (MCD) suite à l'activation de la signalisation IRE 1 α induite par le stress du RE (Lee et al., 2019). La transcription de XBP1 (*X-box-binding protein 1*) est le seul facteur de transcription connu en aval de IRE1 α (So et al., 2012). XBP1 est un facteur de transcription clé impliqué dans l'inflammation induite par le stress du RE (Kim et al. 2008). En outre XBP1 induit la transcription de GFAT1, l'enzyme limitante la voie des hexosamines (Wang et al., 2014). Ces données suggèrent que l'activateur en amont de la voie des hexosamines est régulé par la transcription de XBP1 et est une boucle régulatrice positive pour l'initiation du processus physiopathologique de la MASH.

Nous avons aussi observé que l'expression de l'*Ogt* est augmentée parallèlement à l'augmentation de la fibrose hépatique. La fibrose hépatique est le facteur pronostic, le plus important dans la MASLD et le risque de mortalité hépatique augmente de façon exponentielle avec l'augmentation du stade de fibrose (Dulai et al., 2017). Cependant, une étude récemment publiée a montré une réduction de la O-GlcNAcylation chez les patients ayant une cirrhose (Robarts et al., 2023). L'augmentation de la O-GlcNAcylation pourrait être un événement précoce dans la physiopathologie de la MASH (stéatose et stéatohépatite avec fibrose initiale) suivie par une altération de l'homéostasie de l'O-GlcNAcylation hépatique dans la cirrhose.

A l'heure actuelle, seules quelques études ont exploré la corrélation entre la O-GlcNAcylation et la fibrose hépatique. Comme décrit dans le Chapitre 1 de l'introduction, les cellules étoilées hépatiques sont la principale source de la matrice extracellulaire dans le foie (Pinzani et Rombouts, 2004) et leur activation contribue à

la fibrogénèse. Fait intéressant, la O-GlcNAcylation est impliquée dans l'activation des cellules étoilées et la production de collagène (Fan et al., 2013). L'activation des cellules étoilées est liée à l'inactivation de FoxO1, conduisant à la fibrose dans la MASLD (Adachi et al., 2007). Paradoxalement, l'expression et l'activité de FoxO1 sont augmentées dans le foie des patients ayant une MASH (Valenti et al., 2008). Étant donné que FoxO1 joue un rôle essentiel dans la fibrose et pourrait être O-GlcNAcylé, il serait essentiel d'élucider le rôle de la O-GlcNAcylation de FoxO1 dans le contexte de la fibrose hépatique. Nos données montrent également que l'inactivation de l'OGT hépatique induit une ballonnisation, une inflammation et une fibrose hépatique. Il a été montré que l'expression de l'OGT et la O-GlcNAcylation des protéines sont diminuées dans les cellules étoilées isolées de foies de souris avec un régime déficient en méthionine-choline (Li et al., 2021). L'OGT, un régulateur négatif de l'activation des cellules étoilées, exerce un effet protecteur contre la fibrose hépatique en stimulant la O-GlcNAcylation du SRF (*serum response factor*).

En outre, une étude récente a rapporté que les hépatocytes nécroptotiques déficients en OGT sécrètent le facteur trefoil 2 (TFF2), qui induit l'activation, la prolifération et la migration des cellules étoilées *via* la signalisation du récepteur du facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGFR β) (Zhang et al., 2021). Nous avons confirmé ces données chez les souris OGT^{LKO} et ceci pourrait participer au développement de la fibrose dans notre modèle.

Ces résultats, mettant en évidence une augmentation de l'expression de l'OGT et de la O-GlcNAcylation chez les patients atteints de MASLD, pourraient paraître contradictoires avec nos données sur les modèles de délétion de l'OGT hépatocytaire. Cependant il y a plusieurs explications. Premièrement, comme déjà mentionné, le maintien de l'homéostasie de la O-GlcNAcylation est essentiel pour une fonction cellulaire optimale et la perturbation de l'homéostasie de la O-GlcNAcylation a été impliquée dans la pathogenèse d'une multitude de maladies humaines (Yang et Qian 2017). En effet, la délétion de l'OGT hépatocytaire induit un phénotype hépatique très délétère, comme observé dans notre modèle.

L'augmentation de l'expression de l'OGT et de la O-GlcNAcylation hépatique observée chez les patients atteints de MASLD représente un mécanisme de réponse cellulaire

aux stress oxydant et au stress du réticulum endoplasmique qui caractérise le stade initial de la maladie hépatique (Ajoalabady et al., 2023, Fromenty et al., 2023)

Enfin ce mécanisme de réponses aux stress devient déficitaire à l'instauration d'une cirrhose, comme rapporté récemment. *Robarts et al.* ont en effet démontré que la O-GlcNAcylation est maintenue dans la MASH sans cirrhose mais est diminuée dans la MASH avec cirrhose (Robarts et al., 2023).

Enfin, compte tenu du fait que le MASLD est une maladie qui présente un dimorphisme sexuel (Smati et al., 2022, Montefusco et al., 2022, Lefebvre et Staels, 2021, Chia Eng et al., 2023) et que notre modèle de délétion constitutive de l'OGT hépatocytaire présente un dimorphisme hépatique à long terme, nous avons voulu analyser l'expression des gènes liés à l'OGT dans une cohorte de patients présentant un MASH histologiquement prouvée (Cohorte CHU de Toulouse). Le profilage de l'expression génique dans la MASLD met en évidence un dimorphisme sexuel du réseau de gènes dont l'expression hépatique est corrélée à celle de l'*Ogt*. En effet, à l'analyse des gènes montrant une expression d'ARNm fortement corrélée avec l'ARNm de l'*Ogt* chez les hommes et les femmes, nous avons observé des voies communes aux deux sexes (métabolisme de l'ARN, réponse cellulaire au stress, traduction, réponse aux infections virales, biogénèse des complexes des ribonucléoprotéines etc) et des voies spécifiques aux hommes (voie du VEGF, signalisation AKT dans le cancer) et aux femmes (voie Rho-Kinase, assemblage du complexe mitochondrial IV et organisation mitochondriale).

Ces données très intéressantes devront être validées dans d'autres cohortes de patients, afin de mieux comprendre la physiopathologie de la MASLD dans les deux sexes et éventuellement identifier des cibles thérapeutiques spécifiques aux hommes et aux femmes, dans une vision de «médecine personnalisée».

Perspectives

Nous avons démontré que l'OGT joue un rôle crucial dans le maintien de l'homéostasie hépatique et que la dérégulation de la O-GlcNAcylation induit un phénotype sévère avec une fibrose avancée et le développement de lésions hépatiques potentiellement évolutives.

La suite de notre projet sera d'élucider le mécanisme sous-jacent des modifications importantes observées en l'absence de l'OGT hépatocytaire. L'altération de la signalisation de FXR pourrait être un possible mécanisme physiopathologique. Nous avons, en fait, observé que les souris OGT^{LKO} ont une expression diminuée de *Fxr* et de certains de ses gènes cibles (*Cyp7a1*, *Cyp2c70*, *Lxr*, *Shp*) dans le foie à 8 semaines de vie. Cette diminution est corrélée à une modification du profil des acides biliaires sériques, avec une réduction des agonistes (UDCA et de LCA) et une augmentation des antagonistes (β MCA) de FXR. Nous allons poursuivre l'analyse des acides biliaires sériques et fécaux, de la signalisation de FXR au niveau intestinal et hépatique dans le modèle de délétion inductible de l'OGT hépatocytaire. Nous allons, en outre, réaliser des expériences *in vivo* et *in vitro* avec des agonistes (acide obéticolique et tropifexor) de FXR pour élucider si la réduction de la signalisation de FXR est la cause ou la conséquence du phénotype hépatique observé suite à la délétion de l'OGT hépatocytaire. Dans ce contexte, nous allons développer dans notre laboratoire la technique des « liver slices » qui permet d'évaluer les effets d'un traitement en maintenant tous les types cellulaires hépatiques et le dialogue inter-cellulaire (Hammoutene et al).

De plus, compte tenu l'importance de l'OGT dans la tumorigenèse hépatique (Xu et al., 2017) et le fait que les souris femelles OGT^{LKO} développent des lésions hépatiques, nous allons caractériser ces lésions sur le plan histologique et moléculaire. En effet, le séquençage et le profilage de l'expression génique ont identifié des sous-classes transcriptomiques distinctes et de nombreuses altérations génétiques récurrentes dans les différentes lésions hépatocellulaires (Calderaro et al., 2019). Il serait donc intéressant d'évaluer si l'OGT a un impact sur des mutations génétiques particulières et/ou voies oncogènes.

Enfin un aspect très fascinant de notre projet est l'observation d'un dimorphisme sexuel du réseau de gènes dont l'expression hépatique est corrélée à celle de l'*Ogt* dans la MASLD. Nos données préliminaires devront être validées dans d'autres cohortes de patients, afin de mieux comprendre le rôle de l'OGT dans la physiopathologie de la MASLD dans les deux sexes et éventuellement identifier des cibles thérapeutiques spécifiques aux hommes et aux femmes, dans une vision de « médecine personnalisée ».

Références

Adachi, M.; Osawa, Y.; Uchinami, H.; Kitamura, T.; Accili, D.; Brenner, D.A. The forkhead transcription factor FoxO1 regulates proliferation and transdifferentiation of hepatic stellate cells. *Gastroenterology* 2007, 132, 1434–1446.

Ajoolabady A, Kaplowitz N, Lebeaupin C, Kroemer G, Kaufman RJ, Malhi H, Ren J. Endoplasmic reticulum stress in liver diseases. *Hepatology*. 2023 Feb 1;77(2):619-639. doi: 10.1002/hep.32562.

Akella, N.M., Ciraku, L. & Reginato, M.J. Fueling the fire: emerging role of the hexosamine biosynthetic pathway in cancer. *BMC Biol* 17, 52 (2019). doi.org/10.1186/s12915-019-0671-3.

Akinrotimi O, Riessen R, VanDuyne P, Park JE, Lee YK, Wong LJ, Zavacki AM, Schoonjans K, Anakk S. Small heterodimer partner deletion prevents hepatic steatosis and when combined with farnesoid X receptor loss protects against type 2 diabetes in mice. *Hepatology*. 2017 Dec;66(6):1854-1865. doi: 10.1002/hep.29305.

Aharoni-Simon M, Hann-Obercyger M, Pen S, et al. Fatty liver is associated with impaired activity of PPAR γ -coactivator 1 α (PGC1 α) and mitochondrial biogenesis in mice. *Lab Invest*. 2011, 91, 1018-28.

Ahn SB, Jang K, Jun DW, Lee BH, Shin KJ. Expression of liver X receptor correlates with intrahepatic inflammation and fibrosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Dig Dis Sci*. 2014 Dec;59(12):2975-82. doi: 10.1007/s10620-014-3289-x.

Albillos A, de Gottardi A, Rescigno M. The gut-liver axis in liver disease: Pathophysiological basis for therapy. *J Hepatol*. 2020 Mar;72(3):558-577. doi: 10.1016/j.jhep.2019.10.003.

Alpini G, McGill JM, Larusso NF. The pathobiology of biliary epithelia. *Hepatology*. 2002 May;35(5):1256-68. doi: 10.1053/jhep.2002.33541.

Alpini G, Roberts S, Kuntz SM, Ueno Y, Gubba S, Podila PV, LeSage G, LaRusso NF. Morphological, molecular, and functional heterogeneity of cholangiocytes from normal rat liver. *Gastroenterology*. 1996 May;110(5):1636-43. doi: 10.1053/gast.1996.v110.pm8613073.

Arab JP, Karpen SJ, Dawson PA, et al. Bile acids and nonalcoholic fatty liver disease: molecular insights and therapeutic perspectives. *Hepatology* 2017;65:350–62.

Armstrong LE, Guo GL. Role of FXR in Liver Inflammation during Nonalcoholic Steatohepatitis. *Curr Pharmacol Rep*. 2017 Apr;3(2):92-100. doi: 10.1007/s40495-017-0085-2.

Baker, N.E. Emerging mechanisms of cell competition. *Nature Reviews Genetics*. 2020; 21, 683–697.

Banales JM, Huebert RC, Karlsen T, Strazzabosco M, LaRusso NF, Gores GJ. Cholangiocyte pathobiology. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2019 May;16(5):269-281. doi: 10.1038/s41575-019-0125-y.

Barkovskaya A, Seip K, Hilmarsdottir B, Maelandsmo GM, Moestue SA, Itkonen HM. O-GlcNAc Transferase Inhibition Differentially Affects Breast Cancer Subtypes. *Sci Rep*. 2019 Apr 5;9(1):5670. doi: 10.1038/s41598-019-42153-6.

Barreby E, Chen P, Aouadi M. Macrophage functional diversity in NAFLD - more than inflammation. *Nat Rev Endocrinol*. 2022 Aug;18(8):461-472. doi: 10.1038/s41574-022-00675-6.

Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. *J Clin Investig*. 2005; 115:209–18. doi:10.1172/JCI24282.

Baudoin, L.; Issad, T. O-GlcNAcylation and Inflammation: A Vast Territory to Explore. *Front. Endocrinol*. 2014, 5, 235.

Bedossa P, Poitou C, Veyrie N, Bouillot JL, Basdevant A, Paradis V, Tordjman J, Clement K. Histopathological algorithm and scoring system for evaluation of liver lesions in morbidly obese patients. *Hepatology*. 2012 Nov;56(5):1751-9. doi: 10.1002/hep.25889.

Belmokhtar, C.A., Hillion, J., and Ségal-Bendirdjian, E. Staurosporine induces apoptosis through both caspase-dependent and caspase-independent mechanisms. *Oncogene*.2001; 20, 3354–3362.

Berrabah W, Aumercier P, Gheeraert C, Dehondt H, Bouchaert E, Alexandre J, Ploton M, Mazuy C, Caron S, Tailleux A, Eeckhoutte J, Lefebvre T, Staels B, Lefebvre P. Glucose sensing O-GlcNAcylation pathway regulates the nuclear bile acid receptor farnesoid X receptor (FXR). *Hepatology*. 2014 May;59(5):2022-33. doi: 10.1002/hep.26710.

Blériot C, Barreby E, Dunsmore G, Ballaire R, Chakarov S, Ficht X, De Simone G, Andreatta F, Fumagalli V, Guo W, Wan G, Gessain G, Khalilnezhad A, Zhang XM, Ang N, Chen P, Morgantini C, Azzimato V, Kong WT, Liu Z, Pai R, Lum J, Shihui F, Low I, Xu C, Malleret B, Kairi MFM, Balachander A, Cexus O, Larbi A, Lee B, Newell EW, Ng LG, Phoo WW, Sobota RM, Sharma A, Howland SW, Chen J, Bajenoff M, Yvan-Charvet L, Venteclef N, Iannacone M, Aouadi M, Ginhoux F. A subset of Kupffer cells regulates metabolism through the expression of CD36. *Immunity*. 2021 Sep 14;54(9):2101-2116.e6. doi: 10.1016/j.immuni.2021.08.006.

Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol*. 1959 Aug;37(8):911-7. doi: 10.1139/o59-099.

Bond MR, Hanover JA. A little sugar goes a long way: the cell biology of O-GlcNAc. *J Cell Biol.* 2015 Mar 30;208(7):869-80. doi: 10.1083/jcb.201501101.

Bouwens L, Baekeland M, De Zanger R, Wisse E. Quantitation, tissue distribution and proliferation kinetics of Kupffer cells in normal rat liver. *Hepatology.* 1986;6:718–722.

Brand MD. The sites and topology of mitochondrial superoxide production. *Exp Gerontol.* 2010, 45, 466-72.

Brown MS, Goldstein JL. Selective versus total insulin resistance: a pathogenic paradox. *Cell Metab.* 2008, 7, 95-6.

Buko VU, Kuzmitskaya-Nikolaeva IA, Naruta EE, Lukivskaya OY, Kirko SN, Tauschel HD. Ursodeoxycholic acid dose-dependently improves liver injury in rats fed a methionine- and choline-deficient diet. *Hepatol Res.* 2011 Jul;41(7):647-59. doi: 10.1111/j.1872-034X.2011.00820.x.

Bullen JW, Balsbaugh JL, Chanda D, Shabanowitz J, Hunt DF, Neumann D, Hart GW. Cross-talk between two essential nutrient-sensitive enzymes: O-GlcNAc transferase (OGT) and AMP-activated protein kinase (AMPK). *J Biol Chem.* 2014 Apr 11;289(15):10592-10606. doi: 10.1074/jbc.M113.523068.

Butkinaree C, Cheung WD, Park S, Park K, Barber M, Hart GW. Characterization of beta-N-acetylglucosaminidase cleavage by caspase-3 during apoptosis. *J Biol Chem.* 2008 Aug 29;283(35):23557-66. doi: 10.1074/jbc.M804116200.

Calderaro J, Zioli M, Paradis V, Zucman-Rossi J. Molecular and histological correlations in liver cancer. *J Hepatol.* 2019 Sep;71(3):616-630. doi: 10.1016/j.jhep.2019.06.001.

Chávez-Talavera O, Tailleux A, Lefebvre P, et al. Bile acid control of metabolism and inflammation in obesity, type 2 diabetes, dyslipidemia, and nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 2017;152:1679–94.

Chen PH, Chi JT, Boyce M. KEAP1 has a sweet spot: A new connection between intracellular glycosylation and redox stress signaling in cancer cells. *Mol Cell Oncol.* 2017 Aug 17;4(6):e1361501. doi: 10.1080/23723556.2017.1361501

Chen PH, Smith TJ, Wu J, Siesser PF, Bisnett BJ, Khan F, Hogue M, Soderblom E, Tang F, Marks JR, Major MB, Swarts BM, Boyce M, Chi JT. Glycosylation of KEAP1 links nutrient sensing to redox stress signaling. *EMBO J.* 2017 Aug 1;36(15):2233-2250. doi: 10.15252/embj.201696113.

Chen PH, Chi JT, Boyce M. Functional crosstalk among oxidative stress and O-GlcNAc signaling pathways. *Glycobiology.* 2018 Aug 1;28(8):556-564. doi: 10.1093/glycob/cwy027.

Chen H, Liu H, Qing G. Targeting oncogenic Myc as a strategy for cancer treatment. *Signal Transduct Target Ther.* 2018 Feb 23;3:5. doi: 10.1038/s41392-018-0008-7.

Chia Eng Pei, Forlano Roberta, Tan Trici, Manousou Pinelopi, S Dhillio Waljit, Izzi-Engbeava Chioma. Non-alcoholic fatty liver disease in Women – Current Knowledge and Emerging Concepts. *JHep Reports* in press.

Collins SL, Stine JG, Bisanz JE, Okafor CD, Patterson AD. Bile acids and the gut microbiota: metabolic interactions and impacts on disease. *Nat Rev Microbiol.* 2023 Apr;21(4):236-247. doi: 10.1038/s41579-022-00805-x. Epub 2022 Oct 17.

Comtesse N, Maldener E, Meese E. Identification of a nuclear variant of MGEA5, a cytoplasmic hyaluronidase and a beta-N-acetylglucosaminidase. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001 May 11;283(3):634-40. doi: 10.1006/bbrc.2001.4815.

Couinaud C. *Le foie : études anatomiques et chirurgicales.* Masson & Cie. Paris , 1957

Cui, Y. et al. SENP7 potentiates cGAS activation by relieving SUMO-mediated inhibition of cytosolic DNA sensing. *PLOS Pathog.* 2017; 13, e1006156.

Danić, M. et al. Pharmacological applications of bile acids and their derivatives in the treatment of metabolic syndrome. *Front. Pharmacol.* 2018 ; 9, 1382.

Davies LC, Jenkins SJ, Allen JE, Taylor PR. Tissue-resident macrophages. *Nat Immunol.* 2013 Oct;14(10):986-95. doi: 10.1038/ni.2705. Epub 2013 Sep 18.

Davis JG. The case for fluoridised milk for children. *J Dent Assoc S Afr.* 1978 Oct;33(10):556-7. PMID: 295310.

de Carvalho Vidigal F, Guedes Cocate P, Gonçalves Pereira L, de Cássia Gonçalves Alfenas R. The role of hyperglycemia in the induction of oxidative stress and inflammatory process. *Nutr Hosp.* 2012 Sep-Oct;27(5):1391-8. doi: 10.3305/nh.2012.27.5.5917.

de Queiroz RM, Carvalho E, Dias WB. O-GlcNAcylation: The Sweet Side of the Cancer. *Front Oncol.* 2014 Jun 3;4:132. doi: 10.3389/fonc.2014.00132.

de Queiroz RM, Madan R, Chien J, Dias WB, Slawson C. Changes in O-Linked N-Acetylglucosamine (O-GlcNAc) Homeostasis Activate the p53 Pathway in Ovarian Cancer Cells. *J Biol Chem.* 2016 Sep 2;291(36):18897-914. doi: 10.1074/jbc.M116.734533.

Decourcelle A, Very N, Djouina M, Loison I, Thévenet J, Body-Malapel M, Lelièvre E, Coqueret O, Leprince D, El Yazidi-Belkoura I, Dehennaut V. O-GlcNAcylation Links Nutrition to the Epigenetic Downregulation of *UNC5A* during Colon Carcinogenesis. *Cancers (Basel).* 2020 Oct 28;12(11):3168. doi: 10.3390/cancers12113168.

Dentin R, Hedrick S, Xie J, Yates J 3rd, Montminy M. Hepatic glucose sensing via the CREB coactivator CRT2. *Science.* 2008 Mar 7;319(5868):1402-5. doi: 10.1126/science.1151363.

Dentin R, Tomas-Cobos L, Fougelle F, Leopold J, Girard J, Postic C, Ferré P. Glucose 6-phosphate, rather than xylulose 5-phosphate, is required for the activation of ChREBP in response to glucose in the liver. *J Hepatol*. 2012 Jan;56(1):199-209. doi: 10.1016/j.jhep.2011.07.019.

Dewidar B, Meyer C, Dooley S, Meindl-Beinker AN. TGF- β in Hepatic Stellate Cell Activation and Liver Fibrogenesis-Updated 2019. *Cells*. 2019 Nov 11;8(11):1419. doi: 10.3390/cells8111419.

Dickinson S, Hancock DP, Petocz P, Ceriello A, Brand-Miller J. High-glycemic index carbohydrate increases nuclear factor-kappaB activation in mononuclear cells of young, lean healthy subjects. *Am J Clin Nutr*. 2008 May;87(5):1188-93. doi: 10.1093/ajcn/87.5.1188.

Diehl JA, Cheng M, Roussel MF, Sherr CJ. Glycogen synthase kinase-3beta regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization. *Genes Dev*. 1998 Nov 15;12(22):3499-511. doi: 10.1101/gad.12.22.3499.

Dixon LJ, Barnes M, Tang H, Pritchard MT, Nagy LE. Kupffer cells in the liver. *Compr Physiol*. 2013 Apr;3(2):785-97. doi: 10.1002/cphy.c120026.

Dong XC. FOXO transcription factors in non-alcoholic fatty liver disease. *Liver Res*. 2017 Sep;1(3):168-173. doi: 10.1016/j.livres.2017.11.004.

Donne R, Saroul-Aïnama M, Cordier P, Celton-Morizur S, Desdouets C. Polyploidy in liver development, homeostasis and disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2020 Jul;17(7):391-405. doi: 10.1038/s41575-020-0284-x.

Donovan K, Alekseev O, Qi X, Cho W, Azizkhan-Clifford J. O-GlcNAc modification of transcription factor Sp1 mediates hyperglycemia-induced VEGF-A upregulation in retinal cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2014 Oct 28;55(12):7862-73. doi: 10.1167/iovs.14-14048.

Drougat L, Olivier-Van Stichelen S, Mortuaire M, Foulquier F, Lacoste AS, Michalski JC, Lefebvre T, Vercoutter-Edouart AS. Characterization of O-GlcNAc cycling and proteomic identification of differentially O-GlcNAcylated proteins during G1/S transition. *Biochim Biophys Acta*. 2012 Dec;1820(12):1839-48. doi: 10.1016/j.bbagen.2012.08.024.

Du D, Shi YH, Le GW. Oxidative stress induced by high-glucose diet in liver of C57BL/6J mice and its underlying mechanism. *Mol Biol Rep*. 2010 Dec;37(8):3833-9. doi: 10.1007/s11033-010-0039-9.

Du, K., Ramachandran, A., and Jaeschke, H. Oxidative stress during acetaminophen hepatotoxicity: Sources, pathophysiological role and therapeutic potential. *Redox. Biol*. 2016; 10:148–156.

Dulai, P.S.; Singh, S.; Patel, J.; Soni, M.; Prokop, L.J.; Younossi, Z.; Sebastiani, G.; Ekstedt, M.; Hagstrom, H.; Nasr, P.; et al. Increased risk of mortality by fibrosis stage

in nonalcoholic fatty liver disease: Systematic review and meta-analysis. *Hepatology* 2017, 65, 1557–1565.

Elsen NL, Patel SB, Ford RE, Hall DL, Hess F, Kandula H, Kornienko M, Reid J, Selnick H, Shipman JM, Sharma S, Lumb KJ, Soisson SM, Klein DJ. Insights into activity and inhibition from the crystal structure of human O-GlcNAcase. *Nat Chem Biol.* 2017 Jun;13(6):613-615. doi: 10.1038/nchembio.2357.

Enomoto, A., Itoh, K., Nagayoshi, E., Haruta, J., Kimura, T., O'Connor, T., Harada, T., and Yamamoto, M. High sensitivity of Nrf2 knockout mice to acetaminophen hepatotoxicity associated with decreased expression of ARE-regulated drug metabolizing enzymes and antioxidant genes. *Toxicol. Sci.* 2001; 59, 169–177.

Fan, X.; Chuan, S.; Hongshan, W. Protein O glycosylation regulates activation of hepatic stellate cells. *Inflammation.* 2013; 36, 1248–1252.

Fardini Y, Dehennaut V, Lefebvre T, Issad T. O-GlcNAcylation: A New Cancer Hallmark? *Front Endocrinol (Lausanne).* 2013 Aug 12;4:99. doi: 10.3389/fendo.2013.00099.

Fardini, Y., Masson, E., Boudah, O., Jouira, R. Ben, Cosson, C., Pierre-Eugene, C., Kuo, M.S., and Issad, T. O-GlcNAcylation of FoxO1 in pancreatic β cells promotes Akt inhibition through an IGFBP1-mediated autocrine mechanism. *FASEB Journal.* 2014; 28, 1010–1021.

Farrell G.C., Teoh N., McCuskey R. Hepatic Microcirculation in Fatty Liver Disease. *Anat. Rec. Adv. Integr. Anat. Evol. Biol.* 2008;291:684–692. doi: 10.1002/ar.20715.

Filhoulaud, G., Benhamed, F., Pagesy, P., Bonner, C., Fardini, Y., Ilias, A., Movassat, J., Burnol, A.F., Guilmeau, S., Kerr-Conte, J., et al.. O-GlcNAcylation links TXNIP to inflammasome activation in pancreatic β cells. *Frontiers in Endocrinology.* 2019; 10, 1–11.

Foretz M, Even PC, Viollet B. AMPK Activation Reduces Hepatic Lipid Content by Increasing Fat Oxidation In Vivo. *Int J Mol Sci.* 2018 Sep 19;19(9):2826. doi: 10.3390/ijms19092826.

Franchitto A, Onori P, Renzi A, Carpino G, Mancinelli R, Alvaro D, Gaudio E. Recent advances on the mechanisms regulating cholangiocyte proliferation and the significance of the neuroendocrine regulation of cholangiocyte pathophysiology. *Ann Transl Med.* 2013 Oct;1(3):27. doi: 10.3978/j.issn.2305-5839.2012.10.03.

Friedman SL. Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver. *Physiol Rev.* 2008a Jan;88(1):125-72. doi: 10.1152/physrev.00013.2007.

Fromenty B, Roden M. Mitochondrial alterations in fatty liver diseases. *J Hepatol.* 2023 Feb;78(2):415-429. doi: 10.1016/j.jhep.2022.09.020.

Fuchs CD, Trauner M. Role of bile acids and their receptors in gastrointestinal and hepatic pathophysiology. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2022 Jul;19(7):432-450. doi: 10.1038/s41575-021-00566-7.

Gabbiani G. The myofibroblast in wound healing and fibrocontractive disease. *J Pathol*. 2003 Jul; 200(4): 500-3. Doi:10.1002:path.1427.

Gadd VL, Skoien R, Powell EE, Fagan KJ, Winterford C, Horsfall L, Irvine K, et al. The portal inflammatory infiltrate and ductular reaction in human nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2014;59:1393–1405. doi: 10.1002/hep.26937.

Gao Y, Wells L, Comer FI, Parker GJ, Hart GW. Dynamic O-glycosylation of nuclear and cytosolic proteins: cloning and characterization of a neutral, cytosolic beta-N-acetylglucosaminidase from human brain. *J Biol Chem*. 2001 Mar 30;276(13):9838-45. doi: 10.1074/jbc.M010420200.

Gao X, Chu Y, Wang W, Li W, Zhang W, Cao J, Fu X, Liu H, Chen D, Fan D, Nie Y. Detrimental role of SIX1 in hepatic lipogenesis and fibrosis of non-alcoholic fatty liver disease. *Liver Int*. 2023 Jul;43(7):1473-1485. doi: 10.1111/liv.15578.

Gracia-Sancho J, Caparrós E, Fernández-Iglesias A, Francés R. Role of liver sinusoidal endothelial cells in liver diseases. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2021 Jun;18(6):411-431. doi: 10.1038/s41575-020-00411-3.

Geerts, A.M., Vanheule, E., Praet, M., Van Vlierberghe, H., De Vos, M., and Colle, I. (2008). Comparison of three research models of portal hypertension in mice: macroscopic, histological and portal pressure evaluation. *International Journal of Experimental Pathology*. 2008; 89, 251–263.

Gentric G, Maillet V, Paradis V, Couton D, L'Hermitte A, Panasyuk G, Fromenty B, Celton-Morizur S, Desdouets C. Oxidative stress promotes pathologic polyploidization in nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Invest*. 2015 Mar 2;125(3):981-92. doi: 10.1172/JCI73957.

Géraud C, Evdokimov K, Straub BK, Peitsch WK, Demory A, Dörflinger Y, Schledzewski K, Schmieder A, Schemmer P, Augustin HG, Schirmacher P, Goerdts S. Unique cell type-specific junctional complexes in vascular endothelium of human and rat liver sinusoids. *PLoS One*. 2012;7(4):e34206. doi: 10.1371/journal.pone.0034206.

Gilgenkrantz H, Tordjmann T. Bile acids and FGF receptors: orchestrators of optimal liver regeneration. *Gut*. 2015 Sep;64(9):1351-2. doi: 10.1136/gutjnl-2014-308746.

Gissen P, Arias IM. Structural and functional hepatocyte polarity and liver disease. *J Hepatol*. 2015 Oct;63(4):1023-37. doi: 10.1016/j.jhep.2015.06.015.

Gomez-Ospina N, Potter CJ, Xiao R, et al. Mutations in the nuclear bile acid receptor FXR cause progressive familial intrahepatic cholestasis. *Nat Commun* 2016;7:10713.

Gonzalez-Rellan MJ, Fondevila MF, Fernandez U, Rodríguez A, Varela-Rey M, Veyrat-Durebex C, Seoane S, Bernardo G, Lopitz-Otsoa F, Fernández-Ramos D,

Bilbao J, Iglesias C, Novoa E, Ameneiro C, Senra A, Beiroa D, Cuñarro J, Dp Chantada-Vazquez M, Garcia-Vence M, Bravo SB, Da Silva Lima N, Porteiro B, Carneiro C, Vidal A, Tovar S, Müller TD, Ferno J, Guallar D, Fidalgo M, Sabio G, Herzig S, Yang WH, Cho JW, Martinez-Chantar ML, Perez-Fernandez R, López M, Dieguez C, Mato JM, Millet O, Coppari R, Woodhoo A, Fruhbeck G, Nogueiras R. O-GlcNAcylated p53 in the liver modulates hepatic glucose production. *Nat Commun*. 2021 Aug 20;12(1):5068. doi: 10.1038/s41467-021-25390-0.

Goodwin B, Jones SA, Price RR, Watson MA, McKee DD, Moore LB, Galardi C, Wilson JG, Lewis MC, Roth ME, Maloney PR, Willson TM, Kliewer SA. A regulatory cascade of the nuclear receptors FXR, SHP-1, and LRH-1 represses bile acid biosynthesis. *Mol Cell*. 2000 Sep;6(3):517-26. doi: 10.1016/s1097-2765(00)00051-4.

Gorelik A, Bartual SG, Borodkin VS, Varghese J, Ferenbach AT, van Aalten DMF. Genetic recoding to dissect the roles of site-specific protein O-GlcNAcylation. *Nat Struct Mol Biol*. 2019 Nov;26(11):1071-1077. doi: 10.1038/s41594-019-0325-8.

Gouw AS, van den Heuvel MC, Boot M, Slooff MJ, Poppema S, de Jong KP. Dynamics of the vascular profile of the finer branches of the biliary tree in normal and diseased human livers. *J Hepatol*. 2006 Sep;45(3):393-400. doi: 10.1016/j.jhep.2006.03.015.

Graubardt N, Vugman M, Mouhadeb O, Caliari G, Pasmanik-Chor M, Reuveni D, Zigmund E, Brazowski E, David E, Chappell-Maor L, Jung S, Varol C. Ly6C^{hi} Monocytes and Their Macrophage Descendants Regulate Neutrophil Function and Clearance in Acetaminophen-Induced Liver Injury. *Front Immunol*. 2017 Jun 1;8:626. doi: 10.3389/fimmu.2017.00626.

Grindheim, J.M., Nicetto, D., Donahue, G., and Zaret, K.S. Polycomb Repressive Complex 2 Proteins EZH1 and EZH2 Regulate Timing of Postnatal Hepatocyte Maturation and Fibrosis by Repressing Genes With Euchromatic Promoters in Mice. *Gastroenterology*. 2019; 156, 1834–1848.

Guilbert T, Odin C, Le Grand Y, Gailhouste L, Turlin B, Ezan F, Désille Y, Baffet G, Guyader D. A robust collagen scoring method for human liver fibrosis by second harmonic microscopy. *Opt Express*. 2010 Dec 6;18(25):25794-807. doi: 10.1364/OE.18.025794.

Guinez C, Filhoulaud G, Rayah-Benhamed F, Marmier S, Dubuquoy C, Dentin R, Moldes M, Burnol AF, Yang X, Lefebvre T, Girard J, Postic C. O-GlcNAcylation increases ChREBP protein content and transcriptional activity in the liver. *Diabetes*. 2011 May;60(5):1399-413. doi: 10.2337/db10-0452.

Hamilton JP, Xie G, Raufman JP, Hogan S, Griffin TL, Packard CA, Chatfield DA, Hagey LR, Steinbach JH, Hofmann AF. Human cecal bile acids: concentration and spectrum. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2007 Jul;293(1):G256-63. doi: 10.1152/ajpgi.00027.2007.

Hammoutene A, Laouirem S, Albuquerque M, Colnot N, Brzustowski A, Valla D, Provost N, Delerive P, Paradis V, on behalf of the QUID-NASH research

group, A new NRF2 activator for the treatment of human metabolic dysfunction-associated fatty liver disease, *JHEP Reports* (2023), doi: <https://doi.org/10.1016/j.jhepr.2023.100845>.

Han HS, Kang G, Kim JS, Choi BH, Koo SH. Regulation of glucose metabolism from a liver-centric perspective. *Exp Mol Med*. 2016 Mar 11;48(3):e218. doi: 10.1038/emm.2015.122.

Han J, Kaufman RJ. The role of ER stress in lipid metabolism and lipotoxicity. *J Lipid Res*. 2016, 57, 1329-38.

Han Y, Glaser S, Meng F, Francis H, Marzioni M, McDaniel K, Alvaro D, Venter J, Carpino G, Onori P, Gaudio E, Alpini G, Franchitto A. Recent advances in the morphological and functional heterogeneity of the biliary epithelium. *Exp Biol Med* (Maywood). 2013 May;238(5):549-65. doi: 10.1177/1535370213489926.

Hanover JA, Yu S, Lubas WB, Shin SH, Ragano-Caracciola M, Kochran J, Love DC. Mitochondrial and nucleocytoplasmic isoforms of O-linked GlcNAc transferase encoded by a single mammalian gene. *Arch Biochem Biophys*. 2003 Jan 15;409(2):287-97. doi: 10.1016/s0003-9861(02)00578-7.

Hanover JA, Chen W, Bond MR. O-GlcNAc in cancer: An Oncometabolism-fueled vicious cycle. *J Bioenerg Biomembr*. 2018 Jun;50(3):155-173. doi: 10.1007/s10863-018-9751-2.

Hart GW. Nutrient regulation of signaling and transcription. *J Biol Chem*. 2019 Feb 15;294(7):2211-2231. doi: 10.1074/jbc.AW119.003226.

Hart GW, Housley MP, Slawson C. Cycling of O-linked beta-N-acetylglucosamine on nucleocytoplasmic proteins. *Nature*. 2007;446:1017–22.

Hart GW, Slawson C, Ramirez-Correa G, Lagerlof O. Cross talk between O-GlcNAcylation and phosphorylation: roles in signaling, transcription, and chronic disease. *Annu Rev Biochem*. 2011;80:825–58

Hayes JD, McMahon M, Chowdhry S, Dinkova-Kostova AT. Cancer chemoprevention mechanisms mediated through the Keap1-Nrf2 pathway. *Antioxid Redox Signal*. 2010; 13:1713–1748.

Heckel D, Comtesse N, Brass N, Blin N, Zang KD, Meese E. Novel immunogenic antigen homologous to hyaluronidase in meningioma. *Hum Mol Genet*. 1998 Nov;7(12):1859-72. doi: 10.1093/hmg/7.12.1859.

Hellerbrand C, Stefanovic B, Giordano F, Burchardt ER, Brenner DA. The role of TGFbeta1 in initiating hepatic stellate cell activation in vivo. *J Hepatol*. 1999 Jan;30(1):77-87. doi: 10.1016/s0168-8278(99)80010-5.

Henry Z, Meadows V, Guo GL. FXR and NASH: an avenue for tissue-specific regulation. *Hepatol Commun*. 2023 Apr 14;7(5):e0127. doi: 10.1097/HC9.000000000000127.

Hofmann AF. The enterohepatic circulation of bile acids in mammals: form and functions. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2009 Jan 1;14(7):2584-98. doi: 10.2741/3399.

Holt GD, Hart GW. The subcellular distribution of terminal N-acetylglucosamine moieties. Localization of a novel protein-saccharide linkage, O-linked GlcNAc. *J Biol Chem*. 1986 Jun 15;261(17):8049-57.

Holt JA, Luo G, Billin AN, Bisi J, McNeill YY, Kozarsky KF, Donahee M, Wang DY, Mansfield TA, Kliewer SA, Goodwin B, Jones SA. Definition of a novel growth factor-dependent signal cascade for the suppression of bile acid biosynthesis. *Genes Dev*. 2003 Jul 1;17(13):1581-91. doi: 10.1101/gad.1083503.

Honda A, Miyazaki T, Iwamoto J, Hirayama T, Morishita Y, Monma T, Ueda H, Mizuno S, Sugiyama F, Takahashi S, Ikegami T. Regulation of bile acid metabolism in mouse models with hydrophobic bile acid composition. *J Lipid Res*. 2020 Jan;61(1):54-69. doi: 10.1194/jlr.RA119000395.

Hornbeck PV, Zhang B, Murray B, Kornhauser JM, Latham V, Skrzypek E. PhosphoSitePlus, 2014: mutations, PTMs and recalibrations. *Nucleic Acids Res*. 2015 Jan;43(Database issue):D512-20. doi: 10.1093/nar/gku1267.

Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science*. 1993, 259, 87-91.

Hou W, Syn WK. Role of Metabolism in Hepatic Stellate Cell Activation and Fibrogenesis. *Front Cell Dev Biol*. 2018 Nov 12;6:150. doi: 10.3389/fcell.2018.00150.

Housley MP, Rodgers JT, Udeshi ND, Kelly TJ, Shabanowitz J, Hunt DF, Puigserver P, Hart GW. O-GlcNAc regulates FoxO activation in response to glucose. *J Biol Chem*. 2008 Jun 13;283(24):16283-92. doi: 10.1074/jbc.M802240200.

Hrncir HR, Hantelys F, Gracz AD. Panic at the Bile Duct: How Intrahepatic Cholangiocytes Respond to Stress and Injury. *Am J Pathol*. 2023 Mar 2:S0002-9440(23)00063-9. doi: 10.1016/j.ajpath.2023.02.012.

Huang W , Ma K , Zhang J , et al Nuclear receptor-dependent bile acid signaling is required for normal liver regeneration. *Science* 2006;312: 233–6. doi:10.1126/science.1121435

Hui JM, Hodge A, Farrell GC, et al. Beyond insulin resistance in NASH: TNF- α or adiponectin? *Hepatology*. 2004, 40, 46-54.

Inagaki T, Choi M, Moschetta A, Peng L, Cummins CL, McDonald JG, Luo G, Jones SA, Goodwin B, Richardson JA, Gerard RD, Repa JJ, Mangelsdorf DJ, Kliewer SA. Fibroblast growth factor 15 functions as an enterohepatic signal to regulate bile acid homeostasis. *Cell Metab*. 2005 Oct;2(4):217-25. doi: 10.1016/j.cmet.2005.09.001.

Ito R, Katsura S, Shimada H, Tsuchiya H, Hada M, Okumura T, Sugawara A, Yokoyama A. TET3-OGT interaction increases the stability and the presence of OGT in chromatin. *Genes Cells*. 2014 Jan;19(1):52-65. doi: 10.1111/gtc.12107.

Iyer SP, Hart GW. Roles of the tetratricopeptide repeat domain in O-GlcNAc transferase targeting and protein substrate specificity. *J Biol Chem.* 2003 Jul 4;278(27):24608-16. doi: 10.1074/jbc.M300036200.

James, L. P., McCullough, S. S., Lamps, L. W., and Hinson, J. A. Effect of N-acetylcysteine on acetaminophen toxicity in mice: Relationship to reactive nitrogen and cytokine formation. *Toxicol. Sci.* 2003; 75, 458–467

Jang I, Kim HB, Seo H, Kim JY, Choi H, Yoo JS, Kim JW, Cho JW. O-GlcNAcylation of eIF2 α regulates the phospho-eIF2 α -mediated ER stress response. *Biochim Biophys Acta.* 2015 Aug;1853(8):1860-9. doi: 10.1016/j.bbamcr.2015.04.017.

Jaramillo MC, Zhang DD. 2013. The emerging role of the Nrf2-Keap1 signaling pathway in cancer. *Genes Dev.* 27:2179–2191.

Jia CZ, Liu T, Wang ZP. O-GlcNAcPRED: a sensitive predictor to capture protein O-GlcNAcylation sites. *Mol Biosyst.* 2013 Nov;9(11):2909-13. doi: 10.1039/c3mb70326f.

Jia C, Zuo Y, Zou Q. O-GlcNAcPRED-II: an integrated classification algorithm for identifying O-GlcNAcylation sites based on fuzzy undersampling and a K-means PCA oversampling technique. *Bioinformatics.* 2018 Jun 15;34(12):2029-2036. doi: 10.1093/bioinformatics/bty039.

Jiang M, Xu B, Li X, Shang Y, Chu Y, Wang W, Chen D, Wu N, Hu S, Zhang S, Li M, Wu K, Yang X, Liang J, Nie Y, Fan D. O-GlcNAcylation promotes colorectal cancer metastasis via the miR-101-O-GlcNAc/EZH2 regulatory feedback circuit. *Oncogene.* 2019 Jan;38(3):301-316. doi: 10.1038/s41388-018-0435-5. Epub 2018 Aug 9. Erratum in: *Oncogene.* 2019 Jul;38(28):5744-5745.

Jiao N, Baker SS, Chapa-Rodriguez A, Liu W, Nugent CA, Tsompana M, Mastrandrea L, Buck MJ, Baker RD, Genco RJ, Zhu R, Zhu L. Suppressed hepatic bile acid signalling despite elevated production of primary and secondary bile acids in NAFLD. *Gut.* 2018 Oct;67(10):1881-1891. doi: 10.1136/gutjnl-2017-314307.

Jínek M, Rehwinkel J, Lazarus BD, Izaurrealde E, Hanover JA, Conti E. The superhelical TPR-repeat domain of O-linked GlcNAc transferase exhibits structural similarities to importin alpha. *Nat Struct Mol Biol.* 2004 Oct;11(10):1001-7. doi: 10.1038/nsmb833.

Jones BV, Begley M, Hill C, Gahan CG, Marchesi JR. Functional and comparative metagenomic analysis of bile salt hydrolase activity in the human gut microbiome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008 Sep 9;105(36):13580-5. doi: 10.1073/pnas.0804437105.

Ju Kim E. O-GlcNAc Transferase: Structural Characteristics, Catalytic Mechanism and Small-Molecule Inhibitors. *ChemBiochem.* 2020 Nov 2;21(21):3026-3035. doi: 10.1002/cbic.202000194.

Kaasik K, Kivimäe S, Allen JJ, Chalkley RJ, Huang Y, Baer K, Kissel H, Burlingame AL, Shokat KM, Ptáček LJ, Fu YH. Glucose sensor O-GlcNAcylation coordinates with

phosphorylation to regulate circadian clock. *Cell Metab.* 2013 Feb 5;17(2):291-302. doi: 10.1016/j.cmet.2012.12.017.

Kamemura K, Hayes BK, Comer FI, Hart GW. Dynamic interplay between O-glycosylation and O-phosphorylation of nucleocytoplasmic proteins: alternative glycosylation/phosphorylation of THR-58, a known mutational hot spot of c-Myc in lymphomas, is regulated by mitogens. *J Biol Chem.* 2002 May 24;277(21):19229-35. doi: 10.1074/jbc.M201729200.

Kan Z, Ivancev K, Lunderquist A, McCuskey PA, McCuskey RS, Wallace S. In vivo microscopy of hepatic metastases: dynamic observation of tumor cell invasion and interaction with Kupffer cells. *Hepatology.* 1995 Feb;21(2):487-94.

Kantari-Mimoun C, Castells M, Klose R, Meinecke AK, Lemberger UJ, Rautou PE, Pinot-Roussel H, Badoual C, Schrödter K, Österreicher CH, Fandrey J, Stockmann C. Resolution of liver fibrosis requires myeloid cell-driven sinusoidal angiogenesis. *Hepatology.* 2015 Jun;61(6):2042-55. doi: 10.1002/hep.27635.

Kao HJ, Huang CH, Bretaña NA, Lu CT, Huang KY, Weng SL, Lee TY. A two-layered machine learning method to identify protein O-GlcNAcylation sites with O-GlcNAc transferase substrate motifs. *BMC Bioinformatics.* 2015;16 Suppl 18(Suppl 18):S10. doi: 10.1186/1471-2105-16-S18-S10.

Kawai D, Takaki A, Nakatsuka A, et al. Hydrogen-rich water prevents progression of nonalcoholic steatohepatitis and accompanying hepatocarcinogenesis in mice. *Hepatology.* 2012, 56, 912-21.

Keembiyehetty CN, Krzeslak A, Love DC, Hanover JA. A lipid-droplet-targeted O-GlcNAcase isoform is a key regulator of the proteasome. *J Cell Sci.* 2011 Aug 15;124(Pt 16):2851-60. doi: 10.1242/jcs.083287.

Khan RS, Bril F, Cusi K, Newsome PN. Modulation of insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology.* 2019, 70, 711-24.

Kim E, Kang JG, Kang MJ, Park JH, Kim YJ, Kweon TH, Lee HW, Jho EH, Lee YH, Kim SI, Yi EC, Park HW, Yang WH, Cho JW. O-GlcNAcylation on LATS2 disrupts the Hippo pathway by inhibiting its activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2020 Jun 23;117(25):14259-14269. doi: 10.1073/pnas.1913469117.

Kim, I.; Xu, W.; Reed, J.C. Cell death and endoplasmic reticulum stress: Disease relevance and therapeutic opportunities. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2008, 7, 1013–1030.

Kinnman N, Francoz C, Barbu V, Wendum D, Rey C, Hultcrantz R, Poupon R, Housset C. The myofibroblastic conversion of peribiliary fibrogenic cells distinct from hepatic stellate cells is stimulated by platelet-derived growth factor during liver fibrogenesis. *Lab Invest.* 2003 Feb;83(2):163-73. doi: 10.1097/01.lab.0000054178.01162.e4.

Kleiner, D. E. et al. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology.* 2005; 41, 1313–1321.

Knight, T. R., Ho, Y. S., Farhood, A., and Jaeschke, H. Peroxynitrite is a critical mediator of acetaminophen hepatotoxicity in murine livers: Protection by glutathione. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2002; 303, 468–475.

Ko S, Russell JO, Molina LM, Monga SP. Liver Progenitors and Adult Cell Plasticity in Hepatic Injury and Repair: Knowns and Unknowns. *Annu Rev Pathol.* 2020 Jan 24;15:23-50. doi: 10.1146/annurev-pathmechdis-012419-032824.

Kocabayoglu P, Lade A, Lee YA, Dragomir AC, Sun X, Fiel MI, Thung S, Aloman C, Soriano P, Hoshida Y, Friedman SL. β -PDGF receptor expressed by hepatic stellate cells regulates fibrosis in murine liver injury, but not carcinogenesis. *J Hepatol.* 2015 Jul;63(1):141-7. doi: 10.1016/j.jhep.2015.01.036.

Koelfat KVK, van Mierlo KMC, Lodewick TM, Bloemen JG, van der Kroft G, Amygdalos I, Neumann UP, Dejong CHC, Jansen PLM, Olde Damink SWM, Schaap FG. Bile Salt and FGF19 Signaling in the Early Phase of Human Liver Regeneration. *Hepatol Commun.* 2021 May 5;5(8):1400-1411. doi: 10.1002/hep4.1728.

Koliaki C, Szendroedi J, Kaul K, et al. Adaptation of hepatic mitochondrial function in humans with nonalcoholic fatty liver is lost in steatohepatitis. *Cell Metab.* 2015, 21, 739-46.

Kraegen EW, Cooney GJ, Ye J, Thompson AL. Triglycerides, fatty acids and insulin resistance--hyperinsulinemia. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 2001;109(4):S516-26. doi: 10.1055/s-2001-15114.

Kreppel LK, Blomberg MA, Hart GW. Dynamic glycosylation of nuclear and cytosolic proteins. Cloning and characterization of a unique O-GlcNAc transferase with multiple tetratricopeptide repeats. *J Biol Chem.* 1997 Apr 4;272(14):9308-15. doi: 10.1074/jbc.272.14.9308.

Kreppel LK, Hart GW. Regulation of a cytosolic and nuclear O-GlcNAc transferase. Role of the tetratricopeptide repeats. *J Biol Chem.* 1999 Nov 5;274(45):32015-22. doi: 10.1074/jbc.274.45.32015.

Kuo M, Zilberfarb V, Gangneux N, Christeff N, Issad T. O-glycosylation of FoxO1 increases its transcriptional activity towards the glucose 6-phosphatase gene. *FEBS Lett.* 2008 Mar 5;582(5):829-34. doi: 10.1016/j.febslet.2008.02.010.

Lake AD, Novak P, Hardwick RN, et al. The adaptive endoplasmic reticulum stress response to lipotoxicity in progressive human nonalcoholic fatty liver disease. *Toxicol Sci.* 2014, 137, 26-35.

Lalor PF, Lai WK, Curbishley SM, Shetty S, Adams DH. Human hepatic sinusoidal endothelial cells can be distinguished by expression of phenotypic markers related to their specialised functions in vivo. *World J Gastroenterol.* 2006 Sep 14;12(34):5429-39. doi: 10.3748/wjg.v12.i34.5429.

Lalor PF, Shields P, Grant A, Adams DH. Recruitment of lymphocytes to the human liver. *Immunol Cell Biol.* 2002 Feb;80(1):52-64. doi: 10.1046/j.1440-1711.2002.01062.x. PMID: 11869363.

Lane EA, Choi DW, Garcia-Haro L, Levine ZG, Tedoldi M, Walker S, Danial NN. HCF-1 Regulates De Novo Lipogenesis through a Nutrient-Sensitive Complex with ChREBP. *Mol Cell.* 2019 Jul 25;75(2):357-371.e7. doi: 10.1016/j.molcel.2019.05.019.

Lanza C, Tan EP, Zhang Z, Machacek M, Brinker AE, Azuma M, Slawson C. Reduced O-GlcNAcase expression promotes mitotic errors and spindle defects. *Cell Cycle.* 2016 May 18;15(10):1363-75. doi: 10.1080/15384101.2016.1167297.

Lazarus MB, Nam Y, Jiang J, Sliz P, Walker S. Structure of human O-GlcNAc transferase and its complex with a peptide substrate. *Nature.* 2011 Jan 27;469(7331):564-7. doi: 10.1038/nature09638.

Lebeaupin C, Vallée D, Hazari Y, Hetz C, Chevet E, Bailly-Maitre B. Endoplasmic reticulum stress signalling and the pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol.* 2018 Oct;69(4):927-947. doi: 10.1016/j.jhep.2018.06.008.

Lee EW, Oh W, Song HP, Kim WK. Phosphorylation of p53 at threonine 155 is required for Jab1-mediated nuclear export of p53. *BMB Rep.* 2017 Jul;50(7):373-378. doi: 10.5483/bmbrep.2017.50.7.077.

Lee, D.E.; Lee, S.J.; Kim, S.J.; Lee, H.S.; Kwon, O.S. Curcumin Ameliorates Nonalcoholic Fatty Liver Disease through Inhibition of O-GlcNAcylation. *Nutrients* 2019, 11, 2702.

Lefebvre P, Staels B. Hepatic sexual dimorphism - implications for non-alcoholic fatty liver disease. *Nat Rev Endocrinol.* 2021 Nov;17(11):662-670. doi: 10.1038/s41574-021-00538-6.

Legry V, Francque S, Haas JT, et al. Bile acid alterations are associated with insulin resistance, but not with NASH, in obese subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 2017;102:3783–94.

Lemoine S, Thabut D, Housset C. Portal myofibroblasts connect angiogenesis and fibrosis in liver. *Cell Tissue Res.* 2016 Sep;365(3):583-9. doi: 10.1007/s00441-016-2443-5.

Lemoine S, Cadoret A, El Mourabit H, Thabut D, Housset C. Origins and functions of liver myofibroblasts. *Biochim Biophys Acta.* 2013 Jul;1832(7):948-54. doi: 10.1016/j.bbadis.2013.02.019.

Lemoine S, Cadoret A, Rautou PE, El Mourabit H, Ratziu V, Corpechot C, Rey C, Bosselut N, Barbu V, Wendum D, Feldmann G, Boulanger C, Henegar C, Housset C, Thabut D. Portal myofibroblasts promote vascular remodeling underlying cirrhosis formation through the release of microparticles. *Hepatology.* 2015 Mar;61(3):1041-55. doi: 10.1002/hep.27318.

Leney AC, El Atmioui D, Wu W, Ovaa H, Heck AJR. Elucidating crosstalk mechanisms between phosphorylation and O-GlcNAcylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017 Aug 29;114(35):E7255-E7261. doi: 10.1073/pnas.1620529114.

Li J, Dawson PA. Animal models to study bile acid metabolism. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 2019 May 1;1865(5):895-911. doi: 10.1016/j.bbadis.2018.05.011.

Li J, Wilson A, Kuruba R, Zhang Q, Gao X, He F, Zhang LM, Pitt BR, Xie W, Li S. FXR-mediated regulation of eNOS expression in vascular endothelial cells. *Cardiovasc Res*. 2008 Jan;77(1):169-77. doi: 10.1093/cvr/cvm016.

Li PZ, Li JZ, Li M, Gong JP, He K. An efficient method to isolate and culture mouse Kupffer cells. *Immunol Lett*. 2014 Mar-Apr;158(1-2):52-6. doi: 10.1016/j.imlet.2013.12.002.

Li, R.; Ong, Q.; Wong, C.C.; Chu, E.S.H.; Sung, J.J.Y.; Yang, X.; Yu, J. O-GlcNAcylation inhibits hepatic stellate cell activation. *J.Gastroenterol. Hepatol*. 2021, 36, 3477–3486.

Li T, Chai Y, Chang P, Reng F, Xue Z, Zhang H, Lv Y, Hu L. A modified animal model of hepatic regeneration induced by hilar bile duct ligation. *Sci Rep*. 2021 Oct 12;11(1):20201. doi: 10.1038/s41598-021-99758-z.

Li Z, Li X, Nai S, Geng Q, Liao J, Xu X, Li J. Checkpoint kinase 1-induced phosphorylation of O-linked β -N-acetylglucosamine transferase regulates the intermediate filament network during cytokinesis. *J Biol Chem*. 2017 Dec 1;292(48):19548-19555. doi: 10.1074/jbc.M117.811646.

Liu Q, Tao T, Liu F, Ni R, Lu C, Shen A. Hyper-O-GlcNAcylation of YB-1 affects Ser102 phosphorylation and promotes cell proliferation in hepatocellular carcinoma. *Exp Cell Res*. 2016 Dec 10;349(2):230-238. doi: 10.1016/j.yexcr.2016.10.011.

Liu Y, Huang H, Liu M, Wu Q, Li W, Zhang J (2017b) MicroRNA-24-1 suppresses mouse hepatoma cell invasion and metastasis via directly targeting O-GlcNAc transferase. *Biomed Pharmacother* 91:731–738

Loomba R, Abraham M, Unalp A, et al. Association between diabetes, family history of diabetes, and risk of nonalcoholic steatohepatitis and fibrosis. *Hepatology*. 2012, 56, 943-51

Lothrop AP, Torres MP, Fuchs SM. Deciphering post-translational modification codes. *FEBS Lett*. 2013 Apr 17;587(8):1247-57. doi: 10.1016/j.febslet.2013.01.047.

Love DC, Kochan J, Cathey RL, Shin SH, Hanover JA. Mitochondrial and nucleocytoplasmic targeting of O-linked GlcNAc transferase. *J Cell Sci*. 2003 Feb 15;116(Pt 4):647-54. doi: 10.1242/jcs.00246. Erratum in: *J Cell Sci*. 2003 Mar 1;116(Pt 5):943.

Love DC, Krause MW, Hanover JA. O-GlcNAc cycling: emerging roles in development and epigenetics. *Semin Cell Dev Biol* 2010;21: 646–654.

Lu Q, Zhang X, Liang T, Bai X. O-GlcNAcylation: an important post-translational modification and a potential therapeutic target for cancer therapy. *Mol Med*. 2022 Sep 14;28(1):115. doi: 10.1186/s10020-022-00544-y.

Lu TT, Makishima M, Repa JJ, Schoonjans K, Kerr TA, Auwerx J, Mangelsdorf DJ. Molecular basis for feedback regulation of bile acid synthesis by nuclear receptors. *Mol Cell*. 2000 Sep;6(3):507-15. doi: 10.1016/s1097-2765(00)00050-2.

Lu Z., Bourdi, M., Li, J. H., Aponte, A. M., Chen, Y., Lombard, D. B., Gucek, M., Pohl, L. R., and Sack, M. N. (2011). SIRT3-dependent deacetylation exacerbates acetaminophen hepatotoxicity. *EMBO Rep*. 12, 840–846.

Lubas WA, Frank DW, Krause M, Hanover JA. O-Linked GlcNAc transferase is a conserved nucleocytoplasmic protein containing tetratricopeptide repeats. *J Biol Chem*. 1997 Apr 4;272(14):9316-24. doi: 10.1074/jbc.272.14.9316.

Lubas WA, Hanover JA. Functional expression of O-linked GlcNAc transferase. Domain structure and substrate specificity. *J Biol Chem*. 2000 Apr 14;275(15):10983-8. doi: 10.1074/jbc.275.15.10983. PMID: 10753899.

Lumpkin RJ, Gu H, Zhu Y, Leonard M, Ahmad AS, Clauser KR, Meyer JG, Bennett EJ, Komives EA. Site-specific identification and quantitation of endogenous SUMO modifications under native conditions. *Nat Commun*. 2017 Oct 27;8(1):1171. doi: 10.1038/s41467-017-01271-3.

Lundby A, Lage K, Weinert BT, Bekker-Jensen DB, Secher A, Skovgaard T, Kelstrup CD, Dmytriiev A, Choudhary C, Lundby C, Olsen JV. Proteomic analysis of lysine acetylation sites in rat tissues reveals organ specificity and subcellular patterns. *Cell Rep*. 2012 Aug 30;2(2):419-31. doi: 10.1016/j.celrep.2012.07.006.

Luo, X. et al. Expression of STING is increased in liver tissues from patients with NAFLD and promotes macrophage-mediated hepatic inflammation and fibrosis in mice. *Gastroenterology*. 2018; 155, 1971–1984.

Lv WW, Liu D, Liu XC, Feng TN, Li L, Qian BY, Li WX. Effects of PKM2 on global metabolic changes and prognosis in hepatocellular carcinoma: from gene expression to drug discovery. *BMC Cancer*. 2018 Nov 21;18(1):1150. doi: 10.1186/s12885-018-5023-0.

Mabire M, Hegde P, Hammoutene A, Wan J, Caër C, Sayegh RA, Cadoux M, Allaire M, Weiss E, Thibault-Sogorb T, Lantz O, Goodhardt M, Paradis V, de la Grange P, Gilgenkrantz H, Lotersztajn S. MAIT cell inhibition promotes liver fibrosis regression via macrophage phenotype reprogramming. *Nat Commun*. 2023 Apr 1;14(1):1830. doi: 10.1038/s41467-023-37453-5.

Macauley MS, Vocadlo DJ. Enzymatic characterization and inhibition of the nuclear variant of human O-GlcNAcase. *Carbohydr Res*. 2009 Jun 12;344(9):1079-84. doi: 10.1016/j.carres.2009.04.017.

Majumdar G, Harrington A, Hungerford J, Martinez-Hernandez A, Gerling IC, Raghov R, Solomon S. Insulin dynamically regulates calmodulin gene expression by sequential o-glycosylation and phosphorylation of sp1 and its subcellular compartmentalization in liver cells. *J Biol Chem*. 2006 Feb 10;281(6):3642-50. doi: 10.1074/jbc.M511223200.

Malarkey DE, Johnson K, Ryan L, Boorman G, Maronpot RR. New insights into functional aspects of liver morphology. *Toxicol Pathol*. 2005;33(1):27-34. doi: 10.1080/01926230590881826.

Malhi H., Kaufman R.J. Endoplasmic reticulum stress in liver disease. *J. Hepatol*. 2011, 54, 795–809.

Mansouri A, Gattolliat CH, Asselah T. Mitochondrial Dysfunction and Signaling in Chronic Liver Diseases. *Gastroenterology* 2018;155:629-47. 10.1053/j.gastro.2018.06.083.

Makishima M, Okamoto AY, Repa JJ, Tu H, Learned RM, Luk A, Hull MV, Lustig KD, Mangelsdorf DJ, Shan B. Identification of a nuclear receptor for bile acids. *Science*. 1999 May 21;284(5418):1362-5. doi: 10.1126/science.284.5418.1362.

Makwana V, Ryan P, Patel B, Dukie SA, Rudrawar S. Essential role of O-GlcNAcylation in stabilization of oncogenic factors. *Biochim Biophys Acta Gen Subj*. 2019 Aug;1863(8):1302-1317. doi: 10.1016/j.bbagen.2019.04.002.

Matsuda S, Kobayashi M, Kitagishi Y. Roles for PI3K/AKT/PTEN Pathway in Cell Signaling of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *ISRN Endocrinol*. 2013;2013:472432. doi: 10.1155/2013/472432.

McGreal SR, Bhushan B, Walesky C, McGill MR, Lebofsky M, Kandel SE, Winefield RD, Jaeschke H, Zachara NE, Zhang Z, Tan EP, Slawson C, Apte U. Modulation of O-GlcNAc Levels in the Liver Impacts Acetaminophen-Induced Liver Injury by Affecting Protein Adduct Formation and Glutathione Synthesis. *Toxicol Sci*. 2018 Apr 1;162(2):599-610. doi: 10.1093/toxsci/kfy002.

Menegon S, Columbano A, Giordano S. The dual roles of NRF2 in cancer. *Trends Mol Med*. 2016; 22:578–593.

Mills CD, Kincaid K, Alt JM, Heilman MJ, Hill AM. M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *J Immunol*. 2000 Jun 15;164(12):6166-73. doi: 10.4049/jimmunol.164.12.6166.

Mohanty P, Hamouda W, Garg R, Aljada A, Ghanim H, Dandona P. Glucose challenge stimulates reactive oxygen species (ROS) generation by leucocytes. *J Clin Endocrinol Metab*. 2000 Aug;85(8):2970-3. doi: 10.1210/jcem.85.8.6854.

Monte MJ, Marin JJ, Antelo A, Vazquez-Tato J. Bile acids: chemistry, physiology, and pathophysiology. *World J Gastroenterol*. 2009 Feb 21;15(7):804-16. doi: 10.3748/wjg.15.804.

Montefusco D, Jamil M, Maczys MA, Schroeder W, Levi M, Ranjit S, Allegood J, Bandyopadhyay D, Retnam R, Spiegel S, Cowart LA. Sphingosine kinase 1 mediates sexual dimorphism in fibrosis in a mouse model of NASH. *Mol Metab.* 2022 Aug;62:101523. doi: 10.1016/j.molmet.2022.101523.

Motwani, M., Pesiridis, S. & Fitzgerald, K.A. DNA sensing by the cGAS–STING pathway in health and disease. *Nat Rev Genet.* 2019; 20, 657–674.

Murray PJ, Allen JE, Biswas SK, Fisher EA, Gilroy DW, Goerdts S, Gordon S, Hamilton JA, Ivashkiv LB, Lawrence T, Locati M, Mantovani A, Martinez FO, Mege JL, Mosser DM, Natoli G, Saeij JP, Schultze JL, Shirey KA, Sica A, Suttles J, Udalova I, van Genderachter JA, Vogel SN, Wynn TA. Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. *Immunity.* 2014 Jul 17;41(1):14-20. doi: 10.1016/j.immuni.2014.06.008.

Nahrendorf M, Swirski FK. Abandoning M1/M2 for a Network Model of Macrophage Function. *Circ Res.* 2016 Jul 22;119(3):414-7. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.309194.

Natarajan SK, Eapen CE, Pullimood AB, Balasubramanian KA. Oxidative stress in experimental liver microvesicular steatosis: role of mitochondria and peroxisomes. *J Gastroenterol Hepatol.* 2006 Aug;21(8):1240-9. doi: 10.1111/j.1440-1746.2006.04313.x.

Ngoh GA, Hamid T, Prabhu SD, Jones SP. O-GlcNAc signaling attenuates ER stress-induced cardiomyocyte death. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2009 Nov;297(5):H1711-9. doi: 10.1152/ajpheart.00553.2009.

Nie, H., and Yi, W. O-GlcNAcylation, a sweet link to the pathology of diseases. *Journal of Zhejiang University: 2019; Science B 20.*

Nobili V, Alisi A, Mosca A, et al. Hepatic farnesoid X receptor protein level and circulating fibroblast growth factor 19 concentration in children with NAFLD. *Liver Int* 2018;38:342–9.

Olivier-Van Stichelen S, Dehennaut V, Buzy A, Zacharyus JL, Guinez C, Mir AM, El Yazidi-Belkoura I, Copin MC, Boureme D, Loyaux D, Ferrara P, Lefebvre T. O-GlcNAcylation stabilizes β -catenin through direct competition with phosphorylation at threonine 41. *FASEB J.* 2014 Aug;28(8):3325-38. doi: 10.1096/fj.13-243535.

Omenetti A, Yang L, Li YX, McCall SJ, Jung Y, Sicklick JK, et al. Hedgehog-mediated mesenchymal-epithelial interactions modulate hepatic response to bile duct ligation. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology.* 2007;87(5):499-514, doi: 10.1038/labinvest.3700537.

Pagesy P, Bouaboud A, Feng Z, Hulin P, Issad T. Short O-GlcNAcase Is Targeted to the Mitochondria and Regulates Mitochondrial Reactive Oxygen Species Level. *Cells.* 2022 Jun 2;11(11):1827. doi: 10.3390/cells11111827.

Paredes F, Williams HC, Quintana RA, San Martin A. Mitochondrial Protein Poldip2 (Polymerase Delta Interacting Protein 2) Controls Vascular Smooth Muscle Differentiated Phenotype by O-Linked GlcNAc (N-Acetylglucosamine) Transferase-Dependent Inhibition of a Ubiquitin Proteasome System. *Circ Res.* 2020 Jan 3;126(1):41-56. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.119.315932.

Park SK, Zhou X, Pendleton KE, Hunter OV, Kohler JJ, O'Donnell KA, Conrad NK. A Conserved Splicing Silencer Dynamically Regulates O-GlcNAc Transferase Intron Retention and O-GlcNAc Homeostasis. *Cell Rep.* 2017 Aug 1;20(5):1088-1099. doi: 10.1016/j.celrep.2017.07.017.

Park SW, Zhou Y, Lee J, et al. The regulatory subunits of PI3K, p85 α and p85 β , interact with XBP-1 and increase its nuclear translocation. *Nat Med.* 2010 (A), 16, 429-37.

Park SW, Zhou Y, Lee J, et al. Sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺-ATPase 2b is a major regulator of endoplasmic reticulum stress and glucose homeostasis in obesity. *Proc Natl Acad Sci.* 2010 (B), 107, 19320-5.

Parks DJ, Blanchard SG, Bledsoe RK, Chandra G, Consler TG, Kliewer SA, Stimmel JB, Willson TM, Zavacki AM, Moore DD, Lehmann JM. Bile acids: natural ligands for an orphan nuclear receptor. *Science.* 1999 May 21;284(5418):1365-8. doi: 10.1126/science.284.5418.1365.

Parlati L, Régnier M, Guillou H, Postic C. New targets for NAFLD. *JHEP Rep.* 2021 Aug 8;3(6):100346.

Patel SH, Camargo FD, Yimlamai D. Hippo Signaling in the Liver Regulates Organ Size, Cell Fate, and Carcinogenesis. *Gastroenterology.* 2017 Feb;152(3):533-545. doi: 10.1053/j.gastro.2016.10.047.

Pathak S, Alonso J, Schimpl M, Rafie K, Blair DE, Borodkin VS, Albarbarawi O, van Aalten DMF. The active site of O-GlcNAc transferase imposes constraints on substrate sequence. *Nat Struct Mol Biol.* 2015 Sep;22(9):744-750. doi: 10.1038/nsmb.3063.

Peiseler M, Schwabe R, Hampe J, Kubes P, Heikenwälder M, Tacke F. Immune mechanisms linking metabolic injury to inflammation and fibrosis in fatty liver disease - novel insights into cellular communication circuits. *J Hepatol.* 2022 Oct;77(4):1136-1160. doi: 10.1016/j.jhep.2022.06.012.

Peng C, Zhu Y, Zhang W, Liao Q, Chen Y, Zhao X, Guo Q, Shen P, Zhen B, Qian X, Yang D, Zhang JS, Xiao D, Qin W, Pei H. Regulation of the Hippo-YAP Pathway by Glucose Sensor O-GlcNAcylation. *Mol Cell.* 2017 Nov 2;68(3):591-604.e5. doi: 10.1016/j.molcel.2017.10.010.

Pepe F, Pagotto S, Soliman S, Rossi C, Lanuti P, Braconi C, Mariani-Costantini R, Visone R, Veronese A. Regulation of miR-483-3p by the O-linked N-acetylglucosamine transferase links chemosensitivity to glucose metabolism in liver cancer cells. *Oncogene* 2017; 6:e328.

Pinzani, M.; Rombouts, K. Liver fibrosis: From the bench to clinical targets. *Dig. Liver Dis.* 2004, 36, 231–242

Pircher PC, Kitto JL, Petrowski ML, Tangirala RK, Bischoff ED, Schulman IG, Westin SK. Farnesoid X receptor regulates bile acid-amino acid conjugation. *J Biol Chem.* 2003 Jul 25;278(30):27703-11. doi: 10.1074/jbc.M302128200.

Poisson J, Lemoine S, Boulanger C, Durand F, Moreau R, Valla D, Rautou PE. Liver sinusoidal endothelial cells: Physiology and role in liver diseases. *J Hepatol.* 2017 Jan;66(1):212-227. doi: 10.1016/j.jhep.2016.07.009.

Pore N, Liu S, Shu HK, Li B, Haas-Kogan D, Stokoe D, Milanini-Mongiat J, Pages G, O'Rourke DM, Bernhard E, Maity A. Sp1 is involved in Akt-mediated induction of VEGF expression through an HIF-1-independent mechanism. *Mol Biol Cell.* 2004 Nov;15(11):4841-53. doi: 10.1091/mbc.e04-05-0374.

Puri P, Mirshahi F, Cheung O, et al. Activation and dysregulation of the unfolded protein response in nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterol.* 2008, 134, 568-76.

Robarts DR, McGreal SR, Umbaugh DS, Parkes WS, Kotulkar M, Abernathy S, Lee N, Jaeschke H, Gunewardena S, Whelan SA, Hanover JA, Zachara NE, Slawson C, Apte U. Regulation of Liver Regeneration by Hepatocyte O-GlcNAcylation in Mice. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol.* 2022;13(5):1510-1529. doi: 10.1016/j.jcmgh.2022.01.014.

Robarts DR, Kotulkar M, Paine-Cabrera D, Venneman KK, Hanover JA, Zachara NE, Slawson C, Apte U. The Essential Role of O-GlcNAcylation in Hepatic Differentiation. *bioRxiv [Preprint].* 2023 Feb 17:2023.02.16.528884. doi: 10.1101/2023.02.16.528884.

Rojas-Morales P, Pedraza-Chaverri J, Tapia E. Ketone bodies, stress response, and redox homeostasis. *Redox Biol.* 2020 Jan;29:101395. doi: 10.1016/j.redox.2019.101395.

Roskams TA, Theise ND, Balabaud C, Bhagat G, Bhathal PS, Bioulac-Sage P, Brunt EM, Crawford JM, Crosby HA, Desmet V, Finegold MJ, Geller SA, Gouw AS, Hytioglou P, Knisely AS, Kojiro M, Lefkowitz JH, Nakanuma Y, Olynyk JK, Park YN, Portmann B, Saxena R, Scheuer PJ, Strain AJ, Thung SN, Wanless IR, West AB. Nomenclature of the finer branches of the biliary tree: canals, ductules, and ductular reactions in human livers. *Hepatology.* 2004 Jun;39(6):1739-45. doi: 10.1002/hep.20130.

Roth C, Chan S, Offen WA, Hemsworth GR, Willems LI, King DT, Varghese V, Britton R, Vocadlo DJ, Davies GJ. Structural and functional insight into human O-GlcNAcase. *Nat Chem Biol.* 2017 Jun;13(6):610-612. doi: 10.1038/nchembio.2358.

Ruan HB, Han X, Li MD, Singh JP, Qian K, Azarhoush S, Zhao L, Bennett AM, Samuel VT, Wu J, Yates JR 3rd, Yang X. O-GlcNAc transferase/host cell factor C1 complex regulates gluconeogenesis by modulating PGC-1 α stability. *Cell Metab.* 2012 Aug 8;16(2):226-37. doi: 10.1016/j.cmet.2012.07.006.

Ruan HB, Ma Y, Torres S, Zhang B, Feriod C, Heck RM, Qian K, Fu M, Li X, Nathanson MH, Bennett AM, Nie Y, Ehrlich BE, Yang X. Calcium-dependent O-GlcNAc signaling drives liver autophagy in adaptation to starvation. *Genes Dev.* 2017 Aug 15;31(16):1655-1665. doi: 10.1101/gad.305441.117.

Ruan HB, Nie Y, Yang X. Regulation of protein degradation by O-GlcNAcylation: crosstalk with ubiquitination. *Mol Cell Proteomics.* 2013 Dec;12(12):3489-97. doi: 10.1074/mcp.R113.029751.

Ruf RG, Xu PX, Silvius D, et al. SIX1 mutations cause branchio-oto-renal syndrome by disruption of EYA1- SIX1-DNA complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:8090-5.

Russell JO, Monga SP. Wnt/ β -Catenin Signaling in Liver Development, Homeostasis, and Pathobiology. *Annu Rev Pathol.* 2018 Jan 24;13:351-378. doi: 10.1146/annurev-pathol-020117-044010. Epub 2017 Nov 10.

Saito, C., Zwingmann, C., and Jaeschke, H. Novel mechanisms of protection against acetaminophen hepatotoxicity in mice by glutathione and N-acetylcysteine. *Hepatology.* 2010; 51, 246–254.

Sanyal S, Båvner A, Haroniti A, Nilsson LM, Lundåsen T, Rehnmark S, Witt MR, Einarsson C, Talianidis I, Gustafsson JA, Treuter E. Involvement of corepressor complex subunit GPS2 in transcriptional pathways governing human bile acid biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 Oct 2;104(40):15665-70. doi: 10.1073/pnas.0706736104.

Sayin SI, Wahlström A, Felin J, Jäntti S, Marschall HU, Bamberg K, Angelin B, Hyötyläinen T, Orešič M, Bäckhed F. Gut microbiota regulates bile acid metabolism by reducing the levels of tauro-beta-muricholic acid, a naturally occurring FXR antagonist. *Cell Metab.* 2013 Feb 5;17(2):225-35. doi: 10.1016/j.cmet.2013.01.003.

Sato K, Marzioni M, Meng F, Francis H, Glaser S, Alpini G. Ductular Reaction in Liver Diseases: Pathological Mechanisms and Translational Significances. *Hepatology.* 2019 Jan;69(1):420-430. doi: 10.1002/hep.30150.

Sato M, Suzuki S, Senoo H. Hepatic stellate cells: unique characteristics in cell biology and phenotype. *Cell Struct Funct.* 2003;28:105–112.

Scarpulla RC. Metabolic control of mitochondrial biogenesis through the PGC-1 family regulatory network. *Biochim Biophys Acta.* 2011, 1813, 1269-78.

Schmidt M, Finley D. Regulation of proteasome activity in health and disease. *Biochim Biophys Acta.* 2014;1843:13–25.

Schulz C, Gomez Perdiguero E, Chorro L, Szabo-Rogers H, Cagnard N, Kierdorf K, Prinz M, Wu B, Jacobsen SE, Pollard JW, Frampton J, Liu KJ, Geissmann F. A lineage of myeloid cells independent of Myb and hematopoietic stem cells. *Science.* 2012 Apr 6;336(6077):86-90. doi: 10.1126/science.1219179.

Serviddio G, Bellanti F, Tamborra R, et al. Alterations of hepatic ATP homeostasis and respiratory chain during development of nonalcoholic steatohepatitis in a rodent model. *Eur J Clin Invest.* 2008, 38, 245-52.

Shafi R, Iyer SP, Ellies LG, O'Donnell N, Marek KW, Chui D, Hart GW, Marth JD. The O-GlcNAc transferase gene resides on the X chromosome and is essential for embryonic stem cell viability and mouse ontogeny. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 May 23;97(11):5735-9. doi: 10.1073/pnas.100471497.

Shao J, Ge T, Tang C, Wang G, Pang L, Chen Z. Synergistic anti-inflammatory effect of gut microbiota and lithocholic acid on liver fibrosis. *Inflamm Res.* 2022 Nov;71(10-11):1389-1401. doi: 10.1007/s00011-022-01629-4.

Shetty S, Lalor PF, Adams DH. Liver sinusoidal endothelial cells - gatekeepers of hepatic immunity. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2018 Sep;15(9):555-567. doi: 10.1038/s41575-018-0020-y.

Shi C, Cai Y, Li Y, Li Y, Hu N, Ma S, Hu S, Zhu P, Wang W, Zhou H. Yap promotes hepatocellular carcinoma metastasis and mobilization via governing cofilin/F-actin/lamellipodium axis by regulation of JNK/Bnip3/SERCA/CaMKII pathways. *Redox Biol.* 2018 Apr;14:59-71. doi: 10.1016/j.redox.2017.08.013.

Shmarakov IO, Jiang H, Liu J, Fernandez EJ, Blaner WS. Hepatic stellate cell activation: A source for bioactive lipids. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids.* 2019 May;1864(5):629-642. doi: 10.1016/j.bbalip.2019.02.004.

Sinal CJ, Tohkin M, Miyata M, Ward JM, Lambert G, Gonzalez FJ. Targeted disruption of the nuclear receptor FXR/BAR impairs bile acid and lipid homeostasis. *Cell.* 2000 Sep 15;102(6):731-44. doi: 10.1016/s0092-8674(00)00062-3.

Smati S, Polizzi A, Fougerat A, Ellero-Simatos S, Blum Y, Lippi Y, Régnier M, Laroyenne A, Huillet M, Arif M, Zhang C, Lasserre F, Marrot A, Al Saati T, Wan J, Sommer C, Naylies C, Batut A, Lukowicz C, Fougeray T, Tramunt B, Dubot P, Smith L, Bertrand-Michel J, Hennuyer N, Pradere JP, Staels B, Burcelin R, Lenfant F, Arnal JF, Levade T, Gamet-Payrastre L, Lagarrigue S, Loiseau N, Lotersztajn S, Postic C, Wahli W, Bureau C, Guillaume M, Mardinoglu A, Montagner A, Gourdy P, Guillou H. Integrative study of diet-induced mouse models of NAFLD identifies PPAR α as a sexually dimorphic drug target. *Gut.* 2022 Apr;71(4):807-821. doi: 10.1136/gutjnl-2020-323323.

Smoly I, Shemesh N, Ziv-Ukelson M, Ben-Zvi A, Yeager-Lotem E. An Asymmetrically Balanced Organization of Kinases versus Phosphatases across Eukaryotes Determines Their Distinct Impacts. *PLoS Comput Biol.* 2017 Jan 30;13(1):e1005221. doi: 10.1371/journal.pcbi.1005221.

So J-S, Hur KY, Tarrío M, et al. Silencing of lipid metabolism genes through IRE1 α -mediated mRNA decay lowers plasma lipids in mice. *Cell Metab.* 2012, 16, 487-99.

Sousa-Lima I, Kim HJ, Jones J, Kim YB. Rho-Kinase as a Therapeutic Target for Nonalcoholic Fatty Liver Diseases. *Diabetes Metab J*. 2021 Sep;45(5):655-674. doi: 10.4093/dmj.2021.0197.

Stefan N, Häring HU, Cusi K. Non-alcoholic fatty liver disease: causes, diagnosis, cardiometabolic consequences, and treatment strategies. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2019 Apr;7(4):313-324. doi: 10.1016/S2213-8587(18)30154-2.

Sturm N, Thélu MA, Camous X, Dimitrov G, Ramzan M, Dufeu-Duchesne T, Bonorino P, Guillermet C, Brambilla E, Arvers P, Pernollet M, Leroy V, Zarski JP, Marche PN, Jouvin-Marche E. Characterization and role of intra-hepatic regulatory T cells in chronic hepatitis C pathogenesis. *J Hepatol*. 2010 Jul;53(1):25-35. doi: 10.1016/j.jhep.2010.02.024.

Suh HN, Lee YJ, Kim MO, Ryu JM, Han HJ. Glucosamine-induced Sp1 O-GlcNAcylation ameliorates hypoxia-induced SGLT dysfunction in primary cultured renal proximal tubule cells. *J Cell Physiol*. 2014 Oct;229(10):1557-68. doi: 10.1002/jcp.24599.

Szabo G, Petrasek J. Inflammasome activation and function in liver disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2015, 12, 387-400.

Tacke F. Targeting hepatic macrophages to treat liver diseases. *J Hepatol*. 2017 Jun;66(6):1300-1312. doi: 10.1016/j.jhep.2017.02.026.

Tan, E. P., McGreal, S. R., Graw, S., Tessman, R., Koppel, S. J., Dhakal, P., Zhang, Z., Machacek, M., Zachara, N. E., Koestler, D. C., et al. Sustained O-GlcNAcylation reprograms mitochondrial function to regulate energy metabolism. *J. Biol. Chem.* 2017; 292, 14940–14962

Tan ZW, Fei G, Paulo JA, Bellaousov S, Martin SES, Duveau DY, Thomas CJ, Gygi SP, Boutz PL, Walker S. O-GlcNAc regulates gene expression by controlling detained intron splicing. *Nucleic Acids Res*. 2020 Jun 4;48(10):5656-5669. doi: 10.1093/nar/gkaa263.

Tannour-Louet M, Porteu A, Vaulont S, Kahn A, Vasseur-Cognet M. A tamoxifen-inducible chimeric Cre recombinase specifically effective in the fetal and adult mouse liver. *Hepatology*. 2002 May;35(5):1072-81. doi: 10.1053/jhep.2002.33164.

Thakare R, Alamoudi JA, Gautam N, Rodrigues AD, Alnouti Y. Species differences in bile acids I. Plasma and urine bile acid composition. *J Appl Toxicol*. 2018 Oct;38(10):1323-1335. doi: 10.1002/jat.3644.

Trapannone R, Mariappa D, Ferenbach AT, van Aalten DM. Nucleocytoplasmic human O-GlcNAc transferase is sufficient for O-GlcNAcylation of mitochondrial proteins. *Biochem J*. 2016 Jun 15;473(12):1693-702. doi: 10.1042/BCJ20160092.

Trauner M, Meier PJ, Boyer JL. Molecular pathogenesis of cholestasis. *N Engl J Med*. 1998 Oct 22;339(17):1217-27. doi: 10.1056/NEJM199810223391707.

Toleman C, Paterson AJ, Whisenhunt TR, Kudlow JE. Characterization of the histone acetyltransferase (HAT) domain of a bifunctional protein with activable O-GlcNAcase and HAT activities. *J Biol Chem*. 2004 Dec 17;279(51):53665-73. doi: 10.1074/jbc.M410406200.

Torres CR, Hart GW. Topography and polypeptide distribution of terminal N-acetylglucosamine residues on the surfaces of intact lymphocytes. Evidence for O-linked GlcNAc. *J Biol Chem*. 1984 Mar 10;259(5):3308-17.

Thibaut MM, Bindels LB. Crosstalk between bile acid-activated receptors and microbiome in entero-hepatic inflammation. *Trends Mol Med*. 2022 Mar;28(3):223-236. doi: 10.1016/j.molmed.2021.12.006.

Tsuchida T, Friedman SL. Mechanisms of hepatic stellate cell activation. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2017 Jul;14(7):397-411. doi: 10.1038/nrgastro.2017.38.

Uriarte I, Fernandez-Barrena MG, Monte MJ, et al. Identification of fibroblast growth factor 15 as a novel mediator of liver regeneration and its application in the prevention of post-resection liver failure in mice. *Gut* 2013;62:899–1. doi:10.1136/gutjnl-2012-302945

Valenti, L.; Rametta, R.; Dongiovanni, P.; Maggioni, M.; Fracanzani, A.L.; Zappa, M.; Lattuada, E.; Roviato, G.; Fargion, S. Increased expression and activity of the transcription factor FOXO1 in nonalcoholic steatohepatitis. *Diabetes*. 2008, 57, 1355–1362.

Vougioukalaki M, Demmers J, Vermeij WP, Baar M, Bruens S, Magaraki A, Kuijk E, Jager M, Merzouk S, Brandt RMC, Kouwenberg J, van Boxtel R, Cuppen E, Pothof J, Hoeijmakers JHJ. Different responses to DNA damage determine ageing differences between organs. *Aging Cell*. 2022 Apr;21(4):e13562. doi: 10.1111/accel.13562. Epub 2022 Mar 4.

Wagner SA, Beli P, Weinert BT, Nielsen ML, Cox J, Mann M, Choudhary C. A proteome-wide, quantitative survey of in vivo ubiquitylation sites reveals widespread regulatory roles. *Mol Cell Proteomics*. 2011 Oct;10(10):M111.013284. doi: 10.1074/mcp.M111.013284.

Wahlström A, Kovatcheva-Datchary P, Ståhlman M, Khan MT, Bäckhed F, Marschall HU. Induction of farnesoid X receptor signaling in germ-free mice colonized with a human microbiota. *J Lipid Res*. 2017 Feb;58(2):412-419. doi: 10.1194/jlr.M072819.

Wang B, Hsu S-H, Frankel W, et al. Stat3-mediated activation of microRNA-23a suppresses gluconeogenesis in hepatocellular carcinoma by down-regulating Glucose-6-phosphatase and peroxisome proliferator-activated receptor gamma, coactivator 1 alpha. *Hepatology*. 2012, 56, 186-97.

Wang J, Torii M, Liu H, Hart GW, Hu ZZ. dbOGAP - an integrated bioinformatics resource for protein O-GlcNAcylation. *BMC Bioinformatics*. 2011 Apr 6;12:91. doi: 10.1186/1471-2105-12-91.

Wang L, Chen S, Zhang J, Mao S, Mao W, Zhang W, Guo Y, Wu Y, Wang R, Yan Y, Yao X. Suppressed OGT expression inhibits cell proliferation and modulates EGFR expression in renal cell carcinoma. *Cancer Manag Res.* 2019 Mar 19;11:2215-2223. doi: 10.2147/CMAR.S190642. PMID: 30962710; PMCID: PMC6433112

Wang L, Chen S, Zhang Z, Zhang J, Mao S, Zheng J, Xuan Y, Liu M, Cai K, Zhang W, Guo Y, Zhai W, Yao X. Suppressed OGT expression inhibits cell proliferation while inducing cell apoptosis in bladder cancer. *BMC Cancer.* 2018 Nov 20;18(1):1141. doi: 10.1186/s12885-018-5033-y.

Wang Y, Liu Y. Neutrophil-Induced Liver Injury and Interactions Between Neutrophils and Liver Sinusoidal Endothelial Cells. *Inflammation.* 2021 Aug;44(4):1246-1262. doi: 10.1007/s10753-021-01442-x.

Wang ZV, Deng Y, Gao N, Pedrozo Z, Li DL, Morales CR, Criollo A, Luo X, Tan W, Jiang N, Lehrman MA, Rothermel BA, Lee AH, Lavandero S, Mammen PPA, Ferdous A, Gillette TG, Scherer PE, Hill JA. Spliced X-box binding protein 1 couples the unfolded protein response to hexosamine biosynthetic pathway. *Cell.* 2014 Mar 13;156(6):1179-1192. doi: 10.1016/j.cell.2014.01.014.

Whelan SA, Lane MD, Hart GW. Regulation of the O-linked beta-N-acetylglucosamine transferase by insulin signaling. *J Biol Chem.* 2008 Aug 1;283(31):21411-7. doi: 10.1074/jbc.M800677200.

Wells L, Gao Y, Mahoney JA, Vosseller K, Chen C, Rosen A, Hart GW. Dynamic O-glycosylation of nuclear and cytosolic proteins: further characterization of the nucleocytoplasmic beta-N-acetylglucosaminidase, O-GlcNAcase. *J Biol Chem.* 2002 Jan 18;277(3):1755-61. doi: 10.1074/jbc.m109656200.

Wells L, Vosseller K, Hart GW. Glycosylation of nucleocytoplasmic proteins: signal transduction and O-GlcNAc. *Science.* 2001 Mar 23;291(5512):2376-8. doi: 10.1126/science.1058714.

Wild, A. C., and Mulcahy, R. T. Regulation of gamma-glutamylcysteine synthetase subunit gene expression: Insights into transcriptional control of antioxidant defenses. *Free Radic. Res.* 2000; 32, 281–301.

Whisenhunt TR, Yang X, Bowe DB, Paterson AJ, Van Tine BA, Kudlow JE. Disrupting the enzyme complex regulating O-GlcNAcylation blocks signaling and development. *Glycobiology.* 2006 Jun;16(6):551-63. doi: 10.1093/glycob/cwj096.

Wu Y, Zhang J, Zhang X, Zhou H, Liu G, Li Q. Cancer Stem Cells: A Potential Breakthrough in HCC-Targeted Therapy. *Front Pharmacol.* 2020 Mar 6;11:198. doi: 10.3389/fphar.2020.00198.

Xie Z, Xie T, Liu J, Zhang Q, Xiao X. Emerging Role of Protein O-GlcNAcylation in Liver Metabolism: Implications for Diabetes and NAFLD. *Int J Mol Sci.* 2023 Jan 21;24(3):2142. doi: 10.3390/ijms24032142.

Xiong X, Ren Y, Cui Y, Li R, Wang C, Zhang Y. Obeticholic acid protects mice against lipopolysaccharide-induced liver injury and inflammation. *Biomed Pharmacother.* 2017 Dec;96:1292-1298. doi: 10.1016/j.biopha.2017.11.083.

Xu B, Broome U, Uzunel M, Nava S, Ge X, Kumagai-Braesch M, Hultenby K, Christensson B, Ericzon BG, Holgersson J, Sumitran-Holgersson S. Capillarization of hepatic sinusoid by liver endothelial cell-reactive autoantibodies in patients with cirrhosis and chronic hepatitis. *Am J Pathol.* 2003 Oct;163(4):1275-89. doi: 10.1016/S0002-9440(10)63487-6.

Xu Y, Sun X, Zhang R, Cao T, Cai SY, Boyer JL, Zhang X, Li D, Huang Y. A Positive Feedback Loop of TET3 and TGF- β 1 Promotes Liver Fibrosis. *Cell Rep.* 2020 Feb 4;30(5):1310-1318.e5. doi: 10.1016/j.celrep.2019.12.092.

Xu W, Zhang X, Wu JL, Fu L, Liu K, Liu D, Chen GG, Lai PB, Wong N, Yu J. O-GlcNAc transferase promotes fatty liver-associated liver cancer through inducing palmitic acid and activating endoplasmic reticulum stress. *J Hepatol.* 2017 Aug;67(2):310-320. doi: 10.1016/j.jhep.2017.03.017.

Yamaji, S., Zhang, M., Zhang, J., Endo, Y., Bibikova, E., Goff, S.P., and Cang, Y. (2010). Hepatocyte-specific deletion of DDB1 induces liver regeneration and tumorigenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* . 2010; 107, 22237–22242.

Yang, J., Nie, J., Ma, X. et al. Targeting PI3K in cancer: mechanisms and advances in clinical trials. *Mol Cancer* 18, 26 (2019). <https://doi.org/10.1186/s12943-019-0954-x>.

Yang L, Kwon J, Popov Y, Gajdos GB, Ordog T, Brekken RA, Mukhopadhyay D, Schuppan D, Bi Y, Simonetto D, Shah VH. Vascular endothelial growth factor promotes fibrosis resolution and repair in mice. *Gastroenterology.* 2014 May;146(5):1339-50.e1. doi: 10.1053/j.gastro.2014.01.061.

Yang WH, Kim JE, Nam HW, Ju JW, Kim HS, Kim YS, Cho JW. Modification of p53 with O-linked N-acetylglucosamine regulates p53 activity and stability. *Nat Cell Biol.* 2006 Oct;8(10):1074-83. doi: 10.1038/ncb1470.

Yang, W.H.; Park, S.Y.; Nam, H.W.; Kim, D.H.; Kang, J.G.; Kang, E.S.; Kim, Y.S.; Lee, H.C.; Kim, K.S.; Cho, J.W. NFkappaB activation is associated with its O-GlcNAcylation state under hyperglycemic conditions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2008, 105, 17345–17350.

Yang X, Ongusaha PP, Miles PD, Havstad JC, Zhang F, So WV, Kudlow JE, Michell RH, Olefsky JM, Field SJ, Evans RM. Phosphoinositide signalling links O-GlcNAc transferase to insulin resistance. *Nature.* 2008 Feb 21;451(7181):964-9. doi: 10.1038/nature06668.

Yang X, Qian K. Protein O-GlcNAcylation: emerging mechanisms and functions. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2017 Jul;18(7):452-465. doi: 10.1038/nrm.2017.22.

Yoshimoto S, Loo TM, Atarashi K, et al. Obesity-Induced gut microbial metabolite promotes liver cancer through senescence secretome. *Nature* 2013;499:97–101.

Younossi ZM, Ratziu V, Loomba R, Rinella M, Anstee QM, Goodman Z, Bedossa P, Geier A, Beckebaum S, Newsome PN, Sheridan D, Sheikh MY, Trotter J, Knapple W, Lawitz E, Abdelmalek MF, Kowdley KV, Montano-Loza AJ, Boursier J, Mathurin P, Bugianesi E, Mazzella G, Oliveira A, Cortez-Pinto H, Graupera I, Orr D, Gluud LL, Dufour JF, Shapiro D, Campagna J, Zaru L, MacConell L, Shringarpure R, Harrison S, Sanyal AJ; REGENERATE Study Investigators. Obeticholic acid for the treatment of non-alcoholic steatohepatitis: interim analysis from a multicentre, randomised, placebo-controlled phase 3 trial. *Lancet*. 2019 Dec 14;394(10215):2184-2196. doi: 10.1016/S0140-6736(19)33041-7.

Zeng WQ, Zhang JQ, Li Y, Yang K, Chen YP, Liu ZJ. A new method to isolate and culture rat kupffer cells. *PLoS One*. 2013 Aug 14;8(8):e70832. doi: 10.1371/journal.pone.0070832.

Zhang, B., Li, M.D., Yin, R., Liu, Y., Yang, Y., Mitchell-Richards, K.A., Nam, J.H., Li, R., Wang, L., Iwakiri, Y., et al. O-GlcNAc transferase suppresses necroptosis and liver fibrosis. *JCI Insight* 2019; 4, 1–16.

Zhang, B.; Lapenta, K.; Wang, Q.; Nam, J.H.; Chung, D.; Robert, M.E.; Nathanson, M.H.; Yang, X. Trefoil factor 2 secreted from damaged hepatocytes activates hepatic stellate cells to induce fibrogenesis. *J. Biol. Chem.* 2021, 297, 100887.

Zhang DG, Zhang C, Wang JX, Wang BW, Wang H, Zhang ZH, Chen YH, Lu Y, Tao L, Wang JQ, Chen X, Xu DX. Obeticholic acid protects against carbon tetrachloride-induced acute liver injury and inflammation. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2017 Jan 1;314:39-47. doi: 10.1016/j.taap.2016.11.006.

Zhang K, Yin R, Yang X. O-GlcNAc: A Bittersweet Switch in Liver. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2014 Dec 17;5:221. doi: 10.3389/fendo.2014.00221.

Zhang L , Wang YD , Chen WD , et al Promotion of liver regeneration/repair by farnesoid X receptor in both liver and intestine in mice. *Hepatology* 2012;56:2336–43

Zhang N, Bai H, David KK, Dong J, Zheng Y, Cai J, Giovannini M, Liu P, Anders RA, Pan D. The Merlin/NF2 tumor suppressor functions through the YAP oncoprotein to regulate tissue homeostasis in mammals. *Dev Cell*. 2010 Jul 20;19(1):27-38. doi: 10.1016/j.devcel.2010.06.015.

Zhu G, Tao T, Zhang D, Liu X, Qiu H, Han L, Xu Z, Xiao Y, Cheng C, Shen A. O-GlcNAcylation of histone deacetylases 1 in hepatocellular carcinoma promotes cancer progression. *Glycobiology*. 2016 Aug;26(8):820-833. doi: 10.1093/glycob/cww025.

Zhou Y, Zhou B, Pache L, Chang M, Khodabakhshi AH, Tanaseichuk O, Benner C, Chanda SK. Metascape provides a biologist-oriented resource for the analysis of systems-level datasets. *Nat Commun*. 2019 Apr 3;10(1):1523. doi: 10.1038/s41467-019-09234-6.

Annexes



New targets for NAFLD

Lucia Parlati,^{1,2} Marion Régnier,³ Hervé Guillou,⁴ Catherine Postic^{1,*}



Summary

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is a growing cause of chronic liver disease worldwide. It is characterised by steatosis, liver inflammation, hepatocellular injury and progressive fibrosis. Several preclinical models (dietary and genetic animal models) of NAFLD have deepened our understanding of its aetiology and pathophysiology. Despite the progress made, there are currently no effective treatments for NAFLD. In this review, we will provide an update on the known molecular pathways involved in the pathophysiology of NAFLD and on ongoing studies of new therapeutic targets.

© 2021 Published by Elsevier B.V. on behalf of European Association for the Study of the Liver (EASL). This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Introduction: NAFLD epidemiology and comorbidities

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is a growing cause of chronic liver disease worldwide. It is the most common cause of liver disease and it will be the leading cause of liver transplantation in 2020.¹ The prevalence of NAFLD has increased over time in line with the increase of type 2 diabetes and obesity. Epidemiological studies on NAFLD are often conflicting because of the different diagnostic methods used to define NAFLD (biopsy, ultrasound, elevation of liver function tests, controlled attenuation parameter [CAP], fibroscan or MRI). Indeed, liver biopsy is the gold standard for the diagnosis of NAFLD, but because of its invasiveness, it is not routinely performed. Moreover, the epidemiology of NAFLD varies significantly in different countries. In western countries, NAFLD incidence is about 28/1,000 person/years (PY) in the general population.^{2–4} In Asia the incidence varies from 19/1,000 PY to 86/1,000 PY.^{5,6} Furthermore, as already mentioned, the incidence of NAFLD varies according to the diagnostic method used, from 26–80/1,000 PY in studies based on elevated liver function tests or ultrasound to 34/1,000 in those using magnetic resonance spectrometry.^{7,8} In France, a recently published study from the French Constance Cohort (n = 102,344) reported a prevalence of steatosis of 16.7% (evaluated by Fatty liver index, that is based on BMI, waist circumference, gamma glutamyltransferase [GGT] and triglycerides) and of advanced fibrosis of 2.6% (evaluated by the Forns Index, that is based on platelet count, age, total cholesterol and GGT). In particular, advanced fibrosis was more prevalent among diabetic patients (7.6% vs. 2.5% in obese patients).⁹

NAFLD is characterised by excessive fat deposition in hepatocytes in the absence of risky alcohol consumption¹⁰ and by the presence of features of

the metabolic syndrome, such as insulin resistance, type 2 diabetes and obesity.¹¹ NAFLD is a composite disease which groups 2 main entities: simple steatosis and non-alcoholic steatohepatitis (NASH).¹² The common feature of these 2 entities is the accumulation of fat in hepatocytes (>5% of total liver weight) but NASH is characterised by a more severe liver injury including ballooning of hepatocytes, inflammatory cell infiltration and progressive fibrosis. The pathogenesis of metabolic liver disease involves nutritional overload, genetic factors and environmental factors. Steatosis is the result of caloric overload and an accumulation of mostly triglycerides, but also sphingolipids and phospholipids in hepatocytes. Free fatty acids (FFAs) that are esterified to form hepatic triglycerides are derived principally from adipose tissue lipolysis but also from dietary fat and *de novo* lipogenesis: 59% of FFAs come from adipose tissue lipolysis, 26% from *de novo* lipogenesis and 15% from chylomicrons (diet).^{13–15} Indeed, it has been demonstrated that in NAFLD there is an increase in hepatic *de novo* lipogenesis¹³ and in the secretion of very low-density lipoprotein (VLDL) that could be a compensatory mechanism for the increase in fatty acid influx to the liver.^{15–16}

The pathological accumulation of lipids in the liver and adipose tissue results in lipotoxicity and insulin resistance, which leads to the worsening of steatosis (Fig. 1). Alongside its role in lipid storage, adipose tissue acts as an endocrine organ that secretes hormones and cytokines, called adipokines, such as adiponectin and leptin.¹⁷ Adiponectin has several metabolic functions, such as regulation of fatty acid oxidation, inhibition of lipid accumulation in the liver and the adipose tissue¹⁸ and the maintenance of glucose homeostasis, including hepatic insulin sensitivity.¹⁹ Patients with NAFLD have lower serum adiponectin level, which

Keywords: NAFLD; NASH; SREBP-1c; ChREBP; FXR; LXR; animal models; PPAR α ; NEFA; glucotoxicity; lipotoxicity

Received 2 April 2021; received in revised form 15 July 2021; accepted 17 July 2021; available online 8 August 2021

¹Université de Paris, Institut Cochin, CNRS, INSERM, F-75014 Paris, France; ²Hôpital Cochin, 24 rue du Faubourg Saint Jacques, 75014 Paris, France; ³UCLouvain, Université catholique de Louvain, Walloon Excellence in Life Sciences and BIOTECHNOLOGY, Louvain Drug Research Institute, Metabolism and Nutrition Research Group, Brussels, Belgium; ⁴Toxalim, Université de Toulouse, INRA, ENVT, INP-Purpan, UPS, Toulouse 31027, France

* Corresponding author. Address: Institut Cochin - 24 rue du Faubourg Saint-Jacques, France. E-mail address: catherine.postic@inserm.fr (C. Postic).



contributes to impairment of fatty acid metabolism and promotes a chronic inflammatory state in the liver.²⁰

NAFLD is a progressive liver disease; it is estimated that 5% of patients with simple steatosis and 20% of patients with NASH progress to cirrhosis.¹² The process of fibrosis progression is not completely understood and it can vary considerably from one patient to another. Several risk factors for fibrosis progression have been identified: age, hypertension, obesity, type 2 diabetes, low aspartate aminotransferase/alanine aminotransferase ratio, presence of hepatic comorbidities.^{21,22} It has been reported that patients with simple steatosis may progress by 1 fibrosis stage over approximately 14 years, while patients with NASH may progress by 1 fibrosis stage over about 7 years. Unfortunately, serum liver function tests are not a reliable method of follow-up since a significant proportion (40–60%) of patients with biopsy-proven NASH can have persistent normal serum transaminases; thus, better biomarkers are needed to improve clinical follow-up of high-risk patients. Among the histological characteristics of NASH, fibrosis is the most directly related to survival. Fibrosis stage is important to monitor the clinical risk of progression to cirrhosis and long-term liver outcomes and mortality.²³ Except for hepatocellular carcinoma (HCC) that can develop in a non-cirrhotic liver, all liver complications of NASH occur in the presence of cirrhosis (portal hypertension, ascites, variceal bleeding, hepato-renal syndrome, hepatic encephalopathy, hepato-pulmonary syndrome).²⁴ Moreover, patients with NASH are at risk of cardiovascular mortality due to its strict relationship with metabolic risk factors such as arterial hypertension, dyslipidaemia, type 2 diabetes and obesity.²⁵

The only therapeutic options currently available are the control of risk factors (diabetes, hypertension and dyslipidaemia) and weight loss. In patients with histologically proven NASH and with pooled liver biopsies before and after weight loss, improvement of all the histological features of NASH (steatosis, inflammation, ballooning and fibrosis) was observed in those that achieved $\geq 5\%$ weight loss, while the greatest fibrosis resolution occurred in those with $\geq 10\%$ weight loss.²⁶ Thus, bariatric surgery effectively improves NASH, by reversing steatosis, reducing hepatocyte apoptosis, and reversing hepatic fibrosis, probably also through the modulation of bile acid signalling.^{27,28} Consequently, the mechanisms underlying the ability of bile acids to improve NASH after bariatric surgery are being actively investigated.

It has been demonstrated that treatment with pioglitazone, vitamin E, and obeticholic acid could improve liver necroinflammation in NASH; however, none of these options has received FDA approval for the treatment of NASH.^{29,30} Several other pharmacologic agents targeting steatosis, inflammation, or fibrosis pathways are in clinical trials for the treatment of NASH; more than 50 open phase II and III clinical trials are currently registered at www.clinicaltrials.gov.³¹

Preclinical models of NAFLD/NASH

To date, no molecule studied for the treatment of NASH has shown convincing results in terms of improvement or resolution of liver disease. An effective method of improving the probability of therapeutic success is to develop robust preclinical models that are applicable to humans. Obviously, a preclinical model will never be identical to the human pathology; however, it should mimic a diet similar to humans' diet, leading to the onset of obesity and insulin resistance, associated with systemic

Key points

- Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is a growing cause of chronic liver disease worldwide; it is the most common cause of liver disease and it will be the leading cause of liver transplantation in 2020.
- The pathogenesis of metabolic liver disease involves nutritional overload, genetic and environmental factors.
- NAFLD represents the hepatic manifestation of a multi-organ disease (the metabolic syndrome) which involves dyslipidaemia, obesity, high blood pressure, impaired sensitivity to carbohydrates and type 2 diabetes.
- Several animal models involving specific diets or genetic manipulations have been used to better understand the aetiopathogenesis of NAFLD.
- The aetiopathogenesis of NAFLD is based on a complex interaction between glucose and lipid metabolism in the liver.
- Currently, no drugs have proven efficacy for the treatment of NAFLD; only weight loss has shown efficacy in improving the histological characteristics of NAFLD.
- The ideal drug candidate for NAFLD should improve steatosis, hepatic inflammation and fibrosis, while ameliorating glucose metabolism, insulin resistance and obesity.

inflammation and an increase in serum inflammatory cytokines, such as interleukin (IL)-6 and tumour necrosis factor (TNF) α , and a reduction in serum adiponectin. Furthermore, animal models should develop similar histological changes as human NASH: steatosis, lobular inflammation, hepatocellular ballooning and fibrosis. Finally, once extensive fibrosis is established, they should develop HCC. In mouse models, which are widely used for preclinical research, high-fat diet (and high-sucrose diet) feeding which leads to obesity, glucose intolerance and steatosis does not progress to NASH on most genetic backgrounds.³² Herein, we discuss the advantages and limitations of some of the preclinical models widely used to investigate NAFLD/NASH (Table 1).

Animal models of diet-induced NAFLD

Methionine and choline-deficient diet

The methionine- and choline-deficient (MCD) diet was, until recently, one of the most commonly used dietary models; it induces severe NASH within 2–4 weeks, with steatosis, inflammation and fibrosis. This diet, which is enriched in sucrose (43 kcal%) is deficient in methionine and choline. Methionine is an essential amino acid that is involved in several processes including: i) methylation of DNA, RNA, proteins and lipids though its conversion to S-adenosylmethionine; ii) regulation of oxidation though its conversion to cysteine, the limiting reagent for glutathione synthesis.³³ Methionine deficiency is therefore associated with a reduction in S-adenosylmethionine and decreased synthesis of folate, tRNA and creatine. Moreover, if associated with a shortage of other lipotropic factors such as vitamin B12 and choline, deficiency in methionine is predictive of liver steatosis.³³ Choline is essential for different cellular processes such as the synthesis of phospholipids required for cell membrane assembly, cholinergic neurotransmission, methyl metabolism, transmembrane signalling and transport and cholesterol metabolism.³⁴ Choline deficiency is associated with steatosis since it is necessary for making the phosphatidylcholine portion of VLDL particles. In the absence of choline, VLDL particles are not secreted, lipoperoxidation is increased in hepatocytes,³⁵ which in turn causes a rise in intracellular free radicals associated with DNA damage and carcinogenesis, and

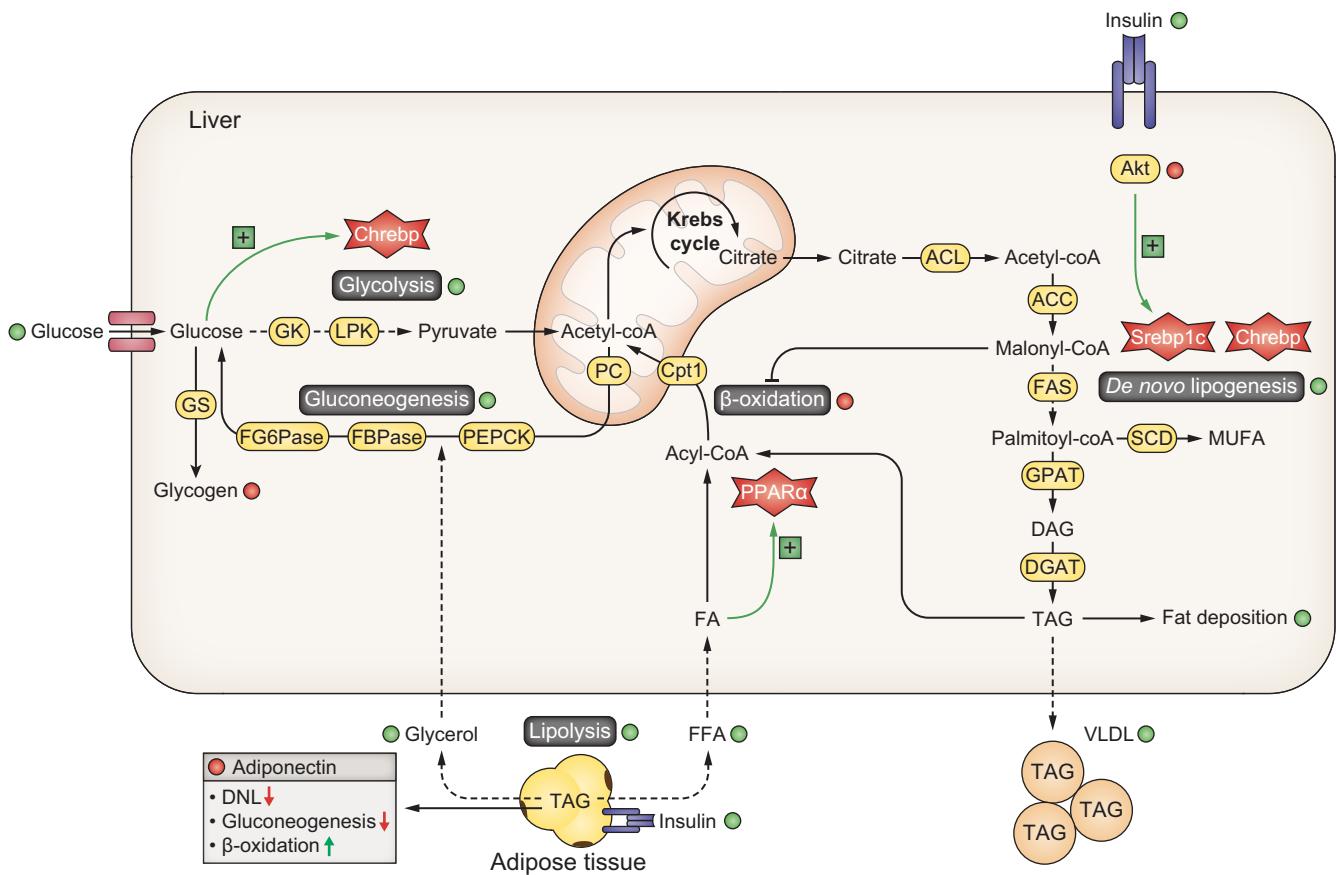


Fig. 1. Insulin resistance and NAFLD. During insulin resistance, glucose delivery increases and activates ChREBP that leads to an increase in glycolysis and *de novo* lipogenesis. Defective hepatic insulin signalling impairs the ability of insulin to inhibit gluconeogenesis while still increasing SREBP1-c-mediated *de novo* lipogenesis. Liver PPAR α activity and β -oxidation are decreased in NAFLD, thereby participating in the accumulation of triglycerides in the liver. Peripheral insulin resistance leads to an incomplete suppression of adipose tissue lipolysis increasing the liberation of free fatty acids and glycerol that reach the liver to increase gluconeogenesis. During insulin resistance and NAFLD, the levels of adipose tissue-producing adiponectin decreased; thus, decreasing β -oxidation and increasing *de novo* lipogenesis and gluconeogenesis. Metabolic pathways that are increased or decreased during NAFLD/insulin resistance are labelled with green or red dots, respectively. ACC, acetyl-CoA carboxylase; ACL, ATP-citrate lyase; ChREBP, carbohydrate responsive element-binding protein; Cpt, carnitine palmitoyltransferase; DAG, diacylglycerol; DPAT, diacylglycerol phosphate acyltransferase; DNL, *de novo* lipogenesis; FA, fatty acid; FAS, fatty acid synthase; FBPase, fructose 1,6-bisphosphatase; FFA, free fatty acid; GK, glucokinase; GPAT, glycerol-3-phosphate acyltransferase; GS, glycogen synthase; LPK, L-type pyruvate kinase; MUFA, monounsaturated fatty acid; NAFLD, non-alcoholic fatty liver disease; PEPCK, phosphoenolpyruvate carboxykinase; PK, pyruvate kinase; PPAR α , peroxisome proliferator-activated receptor α ; SCD1, stearoyl-CoA desaturase 1; SREBP-1c, sterol regulatory element-binding protein-1c; TAG, triacylglycerol; VLDL, very low-density lipoprotein.

apoptosis becomes dysfunctional.³⁶ MCD diet models replicate the histological models of NASH in humans, however this model shows no alteration in glucose tolerance and fasting glycaemia and, more importantly, weight loss occurs while NASH is progressing. In this regard, this model strongly differs from human NASH. Moreover, there is little correlation between gene expression profiles in MCD diet-induced NASH and human NASH.³⁷

Choline-deficient, L-amino acid-defined, high-fat diet

An improvement of the MCD diet was more recently proposed. A mouse model of NASH with fibrosis was established by optimising the methionine content in the context of high-fat diet (HFD) feeding. Mice were fed a choline-deficient, L-amino acid-defined, high-fat diet (CDA HFD) consisting of 60% kcal from fat and 0.1% methionine by weight. Interestingly, in contrast to MCD diet feeding, C57BL/6J mice fed on CDA HFD diet maintain^{29,31}

or even gain weight.³⁸ Plasma levels of alanine aminotransferase increased from the first week, when hepatic steatosis was also observed. By the sixth week, C57BL/6J mice had developed enlarged fatty livers with fibrosis, as assessed by Masson's trichrome staining and by hydroxyproline assay. Therefore, this improved CDA HFD model, in which mice develop rapidly progressive liver fibrosis, is potentially useful for improving our understanding of human NASH and for the development of efficient therapies for this condition.³⁸

Western-like diet

A Western diet (WD) is a diet high in saturated fat, trans-fat, cholesterol and sugar.³⁹ The WD mouse model was designed to induce hepatic steatosis, NASH, and hepatic fibrosis in a pathophysiological manner similar to that observed in humans. Unlike the MCD diet model, the composition of the WD can vary greatly depending on the studies published and therefore, hepatic

Table 1. Dietary animal models of NASH.

| Model name | Characteristics |
|--|---|
| Methionine and choline-deficient diet | <u>Pros:</u> Histological NASH by 2–4 weeks <u>Cons:</u> Weight loss and absence of insulin resistance |
| Choline-deficient L-amino-defined diet | <u>Pros:</u> Histological NASH and hepatocarcinogenesis <u>Cons:</u> Weight stability and absence of insulin resistance |
| Cholesterol and cholate | <u>Pros:</u> Histological NASH by 6–24 weeks, dyslipidaemia, lipoperoxidation and oxidative stress but the major <u>Cons:</u> Absence of insulin resistance, weight loss of 9% and low serum triglycerides |
| High cholesterol diet | <u>Pros:</u> Insulin resistance, increase in free fatty acids, triglycerides and serum aminotransferase levels <u>Cons:</u> Small weight gain and not pronounced liver histological changes, level of dietary cholesterol not applicable to humans |
| High-fat diet | <u>Pros:</u> Insulin resistance, histological NASH by 16 weeks. <u>Cons:</u> Phenotype is not severe |
| High-fructose -fat and -cholesterol diet | <u>Pros:</u> Insulin resistance, histological NASH, liver and fat inflammation. <u>Cons:</u> Not progression to liver advanced fibrosis and carcinogenesis |
| The streptozocin high-fat diet model | <u>Pros:</u> Histological NASH by 20 weeks, progressive liver fibrosis ad HCC. <u>Cons:</u> Beta cells loss function induced by chemical agent and not by insulin resistance et systemic inflammation, transcriptomics profoundly different from humans |
| Diet-induced animal model of NAFLD (DIAMOND) | <u>Pros:</u> Obesity, insulin resistance, dyslipidaemia, liver inflammation by 16 weeks, cirrhosis by 36 weeks and HCC, activation of the unfolded protein response, oxidative stress, apoptosis, fibrogenic process, serum adiponectin reduction and adipose tissue inflammation, concordance in transcriptomic analysis and histological features of HCC similar in mice and human NASH |
| Western-like diet | <u>Pros:</u> Induce hepatic steatosis, NASH and fibrosis <u>Cons:</u> Diet composition is not comparable to human diet |
| Diet- and chemical-induced murine NASH | <u>Pros:</u> Induce hepatic steatosis, insulin resistance, NASH and HCC. Same liver transcriptomic dysregulation of human NASH <u>Cons:</u> Small weight gain |

HCC, hepatocellular carcinoma; NASH, non-alcoholic steatohepatitis.

changes seen in mice fed a WD are variable depending on the content of the diet.⁴⁰ Aside from the administration of a HFD, researchers have explored the impact of adding cholesterol or high-fructose corn syrup on liver injury. High-fructose corn syrup is considered more lipogenic than sucrose, thereby leading to increased development of NAFLD. Kholi *et al.* reported that non-genetically modified mice maintained on a high-fat high-carbohydrate diet (high fat and water with 55% fructose and 45% sucrose (wt/vol)) not only develop obesity but also increased hepatic reactive oxygen species and a NASH-like phenotype with significant fibrosis.⁴¹ For these reasons, studies have analysed the impact of a WD, with high fat, high cholesterol and added high-fructose corn syrup on NASH in mice.⁴² Therefore, these models are highly variable depending on the composition of the diet and are often not reflective of a human WD.

The diet-induced animal model of NAFLD (DIAMOND)

This model is obtained by using an isogenic strain derived from the cross of 2 common mouse strains, 129S1/SvImJ and C57BL/6J. When fed a chow diet, these mice exhibit normal body weight and energy homeostasis. Interestingly, when fed a high-fat high-carbohydrate diet (WD, 42% kcal from fat and 0.1% cholesterol and *ad libitum* administration of glucose/fructose in drinking water), they develop obesity, insulin resistance, dyslipidaemia, liver inflammation (within 16 weeks), progressive liver fibrosis and cirrhosis (within 36 weeks), and HCC when advanced fibrosis is established. This model also mirrors other key pathways activated in human NASH: the unfolded protein response, oxidative stress, apoptosis, fibrogenesis, serum adiponectin reduction and adipose tissue inflammation. Moreover, tran-

scriptomic analysis shows a concordance between preclinical and clinical models and histological features of HCC are similar in mice and human NASH.⁴³

Diet- and chemical-induced murine NASH

This model is obtained by feeding C57BL/6J mice with a WD and by weekly injection of carbon tetrachloride (CCl₄) for 12 and 24 weeks. CCl₄ injection exacerbates histological features of NASH, fibrosis and HCC development. These mice, in fact, developed F3 fibrosis in 12 weeks and HCC in 24 weeks. However, CCl₄ reduced food intake and weight gain was attenuated in these mice compared to mice on a WD without CCl₄, but this did not impact on insulin resistance, which was present in all mice on a WD (regardless of CCl₄ injection). Furthermore, whole liver transcriptomic analysis indicated that dysregulated molecular pathways in WD/CCl₄ mice and immunological features were similar to those of human NASH. The reproducibility of this model and its similarities with human NASH make it suitable for the study of disease pathogenesis and to test new treatments.⁴⁴

Another diet and chemical model of NASH is the streptozocin HFD model that is obtained by giving streptozocin (200 µg) to C57BL/6J mice fed an HFD. These mice develop NASH, fibrosis and HCC in about 20 weeks.⁴⁵ However, in this model, pancreatic β cell loss is caused by streptozocin and not systemic inflammation and insulin resistance. Moreover, there is little correlation between gene expression profiles in this mouse model and in human NASH.⁴⁶

Genetic models of NAFLD/NASH

Genetic and environmental factors such as the diet strongly influence the pathogenesis of NAFLD. The great variation in hepatic lipid accumulation as well as the genetic architecture of NAFLD have been studied in more than 100 inbred mouse strains.³² Moreover, several genetic mouse models are used to mimic

NAFLD/NASH, such as *ob/ob* mice (mutation in the leptin gene), *db/db* mice (mutation in the leptin receptor gene) or *foz/foz* mice (mutation in *Alms1* gene, essential for primary ciliary function). In humans, there are genetic polymorphisms that are strongly associated with susceptibility to NAFLD/NASH, such as mutations in genes encoding for lipid metabolism, glucose metabolism, hypertension, or inflammation. The fact that these mice have a gene modification makes them by definition different from humans. However, the study of specific pathways could help us to understand the aetiology of metabolic liver disease. Often, a specific diet must be used alongside a genetic model to reproduce the histological and metabolic modifications of human NASH.

Leptin-deficient mice (ob/ob mice)

Leptin is a hormone predominantly secreted by adipose cells and enterocytes in the small intestine that is involved in regulation of energy balance by inhibiting hunger. Obesity is associated with decreased sensitivity to leptin, thus resulting in an inability to detect satiety despite high energy stores and high levels of leptin. Leptin-deficient mice develop obesity, insulin resistance and steatosis. Liver histology shows lipotoxicity and lipo-apoptosis, but rarely progression to cirrhosis since *ob/ob* mice are resistant to hepatic fibrosis. However, when these mice are treated with lipopolysaccharide, or fed with a high-fat and MCD diet, they develop liver histological features of NASH without progressive liver fibrosis.⁴⁷ This model is therefore scarcely applicable to the study of NASH since: i) there is no progression towards extensive liver fibrosis; ii) clinical studies have shown that serum leptin levels in men with NAFLD and NASH can be normal or elevated.⁴⁸

db/db mice

db/db mice have a loss of function of the leptin receptor. These mice are obese and exhibit insulin resistance with a fatty liver phenotype. Unlike *ob/ob* mice, *db/db* mice develop extensive liver fibrosis if fed a MCD diet, but the pathophysiological mechanism is not completely understood.⁴⁹ Recent studies reported that iron overload in *db/db* mice induces major features of NAFLD by promoting an increase in hepatic oxidative stress and impaired hepatic mitochondrial β -oxidation and fibrinogenesis.⁵⁰

foz/foz mice

foz/foz mice are mutated or deficient in ALMS1 (Alstrom syndrome protein 1), a ubiquitous protein involved in primary cilia function, intracellular transport and appetite regulation. *foz/foz* mice are obese, insulin resistant and exhibit liver steatosis. When challenged with a HFD, *foz/foz* mice develop NASH, owing to an impairment of metabolic homeostasis.⁵¹

Targeting regulators of fatty acid synthesis and β oxidation

As mentioned in the introduction, different sources of fatty acids contribute to the development of fatty liver. Under conditions of insulin resistance, there is an uncontrolled release of fatty acids by the white adipose tissue, owing to the diminished antilipolytic action of insulin.⁵² Therefore, peripheral fats stored in adipose tissue flow to the liver by way of plasma non-esterified fatty acids (NEFAs). FFAs coming from adipose tissue stimulate gluconeogenesis via acetyl-CoA pyruvate carboxylase. Dietary fatty acids are also taken up by the liver through the uptake of

of elevated plasma glucose (hyperglycaemia) and insulin concentrations (hyperinsulinaemia) promote *de novo* fatty acid synthesis (lipogenesis) and impair β -oxidation, thereby contributing to the development of hepatic steatosis. After the esterification step (conversion of FAs into triglycerides), triglycerides can then be stored as lipid droplets within hepatocytes or secreted into the blood as VLDL (Fig. 1).

Lipogenesis is defined as *de novo* fatty acid synthesis from non-lipid precursors. This pathway is activated by high carbohydrate availability and converts excess carbohydrate into lipids. In the postprandial state, glucose is converted into pyruvate through glycolysis and pyruvate is imported into the mitochondria to join the tricarboxylic acid cycle (TCA) cycle. Citrate formed in the TCA cycle is transported into the cytosol where it is converted to acetyl-CoA by ATP-citrate lyase. *De novo* fatty acid synthesis begins with ATP-dependent carboxylation of acetyl-CoA to malonyl-CoA by acetyl-CoA carboxylase (ACC)-1. Malonyl-CoA which serves as a 2-carbon donor is added to the acetyl-CoA primer by fatty acid synthase (FAS), a multifunctional enzyme complex. Palmitic acid (16:0), a saturated fatty acid (SFA), is the predominant fatty acid generated through lipogenesis. After elongation by fatty acyl-CoA elongase family members, palmitic acid can be transformed to long-chain fatty acids (over 16 carbon chain). Palmitic acid can also be desaturated by stearoyl-CoA desaturase-1 (SCD1) to palmitoleic acid or elongated to form stearic acid (C18:0). SCD1 catalyses the conversion of stearoyl-CoA to oleoyl-CoA, which is a major metabolite in triglyceride synthesis (Fig. 1).⁵³ It has recently been shown that fructose- and sucrose- but not glucose-sweetened beverages promote hepatic *de novo* lipogenesis. In a double-blind randomised trial, 94 healthy men were assigned to daily consumption of sugar-sweetened beverages (SSBs) containing moderate amounts of fructose, sucrose (fructose-glucose disaccharide) or glucose (80 g/day) in addition to their usual diet or SSB abstinence (control group) for 7 weeks. Regular consumption of both fructose- and sucrose-sweetened beverages in moderate doses – associated with stable caloric intake – increases hepatic fatty acid synthesis even in a basal state. Interestingly, this effect was not observed after glucose consumption.⁵⁴ Another study reported that rat liver perfused with fructose showed increased secretion of VLDL-triglycerides and enhanced incorporation of FFAs from the perfusate into VLDL-lipids. Neither of these processes was affected by infusion of glucose.⁵⁵

β -oxidation of fatty acids occurs within the mitochondrial matrix. Short and medium-chain fatty acids (chain lengths up to 12 carbons) can freely enter the mitochondrial matrix. In contrast, long-chain fatty acids must be transported into the mitochondria by the carnitine shuttle, which is a rate-limiting step. β -oxidation involves the sequential removal of 2-carbon segments in the form of acetyl-CoA and production of shortened acyl-CoA, with concurrent reduction of 1 FAD and 1 NAD⁺. The electrons carried by NADH⁺, H⁺ and FADH₂ immediately enter the electron transfer chain in oxidative phosphorylation, whereas acetyl-CoA enters the TCA cycle.

Addressing the mechanisms that cause lipotoxicity may be of interest to identify suitable strategies to prevent or at least retard the development of NASH and/or later syndromes. Several classes of fatty acids are associated with lipotoxicity. SFA accumulation in hepatocytes leads to liver injury through different lipotoxicity processes: i) activation of damage-associated molecular pattern receptors such as Toll-like receptor 4 (TLR4), which triggers NF- κ B and the subsequent production of

inflammatory cytokines and stress kinases⁵³; ii) the death receptor TRAIL-R2 (TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor 2)^{56,57} which triggers caspase 3,6,7 and subsequently promotes apoptosis. Intrahepatic SFAs can also activate endoplasmic reticulum stress and c-Jun N-terminal kinase (JNK) directly. JNK is the major mediator of SFA-induced lipotoxicity since it inactivates insulin receptor substrate-1, impairs mitochondrial respiration and increases the production of reactive oxygen species.⁵⁷ Moreover, JNK inhibits the expression of fibroblast growth factor-21 (FGF21) (a key hepatokine with beneficial properties) by suppressing peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α) activity; it reduces peroxisome β -oxidation and increases the activity of pro-apoptotic protein p53.^{56,57} In addition to hepatocytes, the lipotoxic effects of SFAs were reported on hepatic stellate cells (HSCs). In HSCs, the activation of TLR4 by SFAs leads to the production of pro-inflammatory chemokines that activate JNK in Kupffer cells, the resident macrophages, with subsequent activation, chemotaxis, and secretion of transforming growth factor- β and tissue inhibitor of metalloproteinase.⁵⁸

A better understanding of the interplay between *de novo* lipogenesis and β -oxidation is of great interest in the NAFLD/NASH field. Herein, we focus on key molecular drivers of *de novo* lipogenesis and β oxidation, namely carbohydrate responsive element-binding protein (ChREBP), sterol regulatory element binding protein 1c (SREBP1c) and PPAR α , respectively. We will describe a series of mouse models in which their expression has been genetically modified in the liver and discuss the consequences on hepatic steatosis, insulin resistance and NASH.

ChREBP: A carbohydrate sensor of *de novo* lipogenesis

The transcription factor ChREBP has emerged over the past years as a major regulator of lipogenesis in response to carbohydrates. ChREBP is most abundant in active sites of *de novo* lipogenesis where it has been studied as a master regulator of lipid metabolism.⁵⁹ Following a carbohydrate-enriched meal, ChREBP is upregulated at the transcriptional, translational and post-translational levels. After its translocation to the nucleus, ChREBP undergoes several post-translational modifications dependent on glucose metabolism, such as O-GlcNAcylation or acetylation, both of which are important for its transcriptional activity.⁶⁰ Global ChREBP-deficient (ChREBP^{KO}) mice show reduced hepatic glycolytic and lipogenic gene expression and triglyceride synthesis under high-carbohydrate feeding.⁶¹ Interestingly, ChREBP^{KO} mice fed a HFD develop severe liver injury due to endoplasmic reticulum stress.⁶² In this model, hepatocyte apoptosis was linked to increase cholesterol biosynthesis, since the inhibition of this pathway via SREBP2 or hydroxymethylglutaryl-CoA synthase (the rate-limiting enzyme controlling the mevalonate pathway – the metabolic pathway that produces cholesterol) and other isoprenoids prevented ChREBP^{KO} mice from HFD-induced liver injury. ChREBP loss of function was also associated with sugar intolerance and malabsorption, resulting in dysregulation of sucrose and fructose metabolism in mice.⁶³ ChREBP inhibition in obese and insulin-resistant ob/ob mice, through RNAi leads to reversal of hepatic steatosis, providing a direct proof for the involvement of ChREBP in the pathogenesis of NAFLD.⁶⁴ When fed a chow diet, mice overexpressing ChREBP show normal glucose metabolism without insulin resistance, in spite of the increased expression of genes regulating lipogenesis and fatty acid esterification that promote liver steatosis. Even if fed an HFD, mice overexpressing

ChREBP exhibit liver steatosis without insulin resistance or impairment of glucose metabolism. In clinical models, ChREBP expression was decreased in the presence of insulin resistance and increased in the presence of more than 50% liver steatosis.⁶⁵ These results suggest that ChREBP dissociates the binomial hepatic steatosis from insulin resistance, and its overexpression could be effective in improving both glucose and lipid metabolism. Indeed, the reciprocal relation between hepatic steatosis and insulin sensitivity has greatly evolved in the past decade. Initially, as mentioned, the lipotoxic model prevailed where accumulation of deleterious lipid species (ceramides, diacylglycerols) was held responsible for impaired insulin signalling.⁶⁵ However, more recent studies suggesting dissociation between hepatic steatosis and insulin resistance gave way to another view where the metabolic consequences of hepatic steatosis would instead depend on the specific nature of generated lipid species and/or subcellular localisation. Lipidomic analysis in the livers of ChREBP-overexpressing mice revealed a decrease in SFA concentrations in contrast to enrichment in monounsaturated fatty acids (MUFAs). In mouse hepatocytes, ChREBP overexpression induced the expression of *Scd1*, the enzyme responsible for the conversion of SFAs into MUFAs. SFA impairment of phosphorylation of Akt, a critical insulin-signalling node, was rescued by the elevation of SCD1 levels upon ChREBP overexpression, whereas reduction of SCD1 activity attenuated the beneficial effect of ChREBP on Akt phosphorylation. ChREBP expression in liver biopsies from patients with NASH was increased when steatosis was greater than 50% and decreased in the presence of severe insulin resistance. Together, our results demonstrate that increased ChREBP can dissociate hepatic steatosis from insulin resistance, with beneficial effects on both glucose and lipid metabolism.⁶⁵ More recently, Brincambert *et al.* identified a coactivator of ChREBP: the histone demethylase plant homeodomain finger 2 (Phf2). Using specific deletion of the H3K9me2 methyl-marks on the promoter of the genes regulated by ChREBP, they demonstrated that Phf2 eases the incorporation of precursors into MUFAs, thus promoting the development of liver steatosis without insulin resistance and inflammation. Phf2 activation also protected the liver from oxidative stress and fibrosis in diet-induced obesity models, through the induction of the transcription factor Nrf2 (NF-E2-related factor 2), which redirects glucose metabolism to the pentose phosphate pathway and glutathione biosynthesis. In summary, H3K9me2 demethylation at specific gene promoters by Phf2 protects against steatohepatitis.⁶⁶

SREBP1-c, an insulin-sensitive regulator of *de novo* lipogenesis

In addition to its activation by carbohydrates, *de novo* lipogenesis is also regulated by insulin through the SREBP1-c⁶⁷ transcription factor. Insulin directly activates SREBP1-c by increasing its gene expression and by promoting its proteolytic processing.^{67,68} Consequently, the absence of the insulin receptor in hepatocytes leads to decreased SREBP1-c expression and activity, impacting on triglyceride accumulation.⁶⁹ Like ChREBP, SREBP1-c is induced in hepatic steatosis and its hyperactivation leads to liver triglyceride accumulation.^{70,71} Moreover, hepatocyte-specific deletion of SCAP (SREBF chaperone),⁷¹ the protein that escorts SREBP1-c into the nucleus, fully blocks SREBP1-c activity and prevents hepatic steatosis in genetic and nutritional models of obesity.⁷¹ Dissecting the role of SREBP1-c in the context of insulin resistance is of interest since lipogenesis remains active

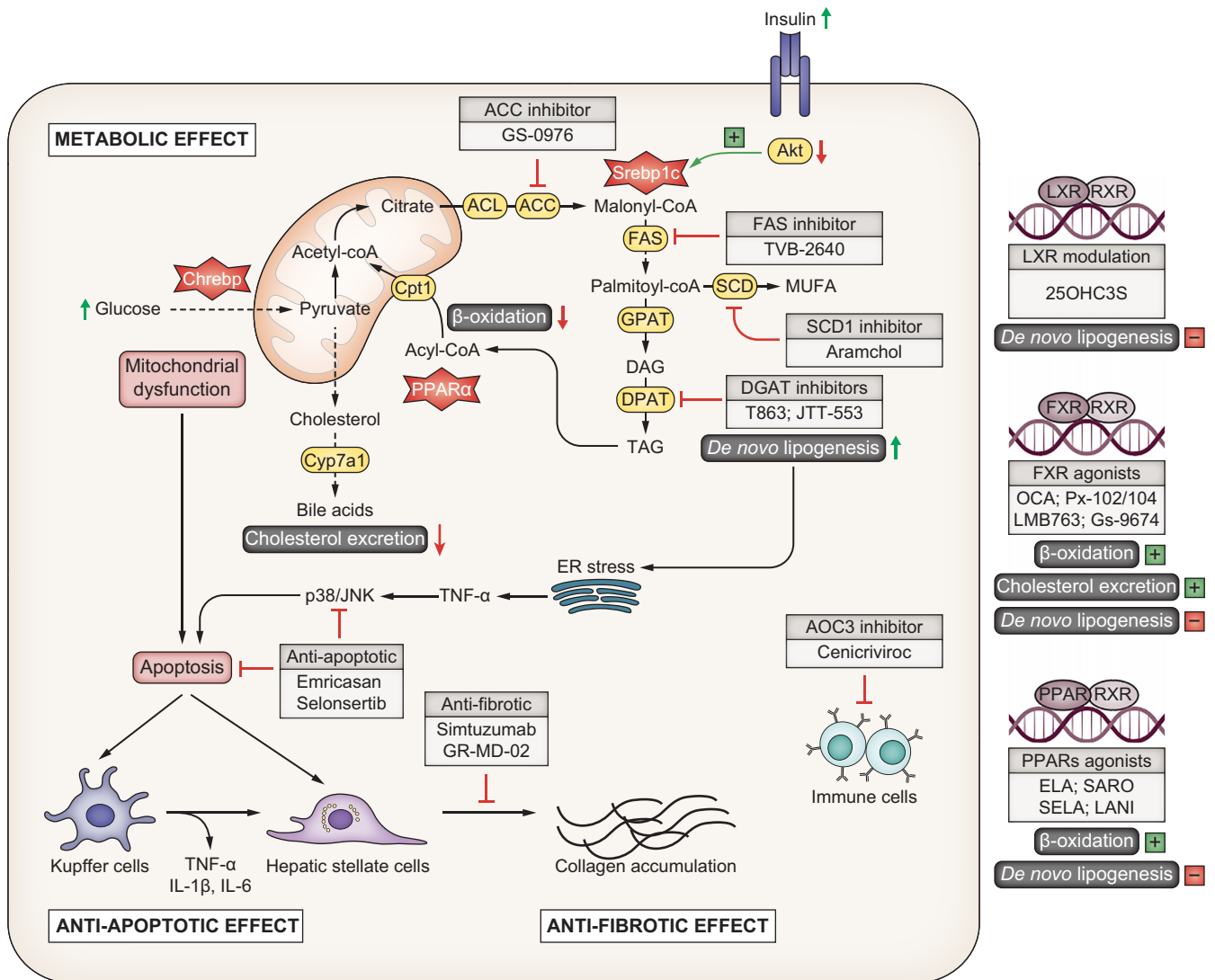


Fig. 2. Therapeutic targets in NAFLD and NASH. Therapeutic approaches in NAFLD target either the metabolism to decrease liver fat deposition or apoptosis and fibrosis to limit the progression of NAFLD. Metabolic treatments mostly target *de novo* lipogenesis, β -oxidation and bile acid metabolism. They can act indirectly by inhibiting enzymes that control *de novo* lipogenesis (inhibitors of FAS, ACC, SCD, DGAT) or be direct analogues (or antagonists) for nuclear receptors involved in *de novo* lipogenesis, β -oxidation and bile acid metabolism. Complications of NAFLD (inflammation, apoptosis and fibrosis) are targeted by different molecules. They have the ability to limit the activation of Kupffer cells and stellate cells by different mechanisms, thereby preventing collagen deposition and fibrosis. ACC, acetyl-CoA carboxylase; ACL, ATP-citrate lyase; AOC3, amine oxidase copper containing 3; ChREBP, carbohydrate responsive element-binding protein; Cpt, carnitine palmitoyltransferase; CYP7A1, cytochrome P450 7A1; DAG, diacylglycerol; DGAT, diacylglycerol acyltransferase; DPAT, diacylglycerol phosphate acyltransferase; ER, endoplasmic reticulum; FAS, fatty acid synthase; FXR, farnesoid X receptor; GPAT, glycerol-3-phosphate acyltransferase; IL-, interleukin-; JNK, c-Jun N-terminal kinase; LXR, liver X receptor; MUFA, monounsaturated fatty acid; NAFLD, non-alcoholic fatty liver disease; NASH, non-alcoholic steatohepatitis; PPAR, peroxisome proliferator-activated receptor; RXR, retinoid X receptor; SCD1, stearoyl-CoA desaturase 1; TAG, triacylglycerol; TNF α , tumour necrosis factor- α .

despite the inability of insulin to suppress hepatic glucose production. The so-called “selective hepatic insulin resistance” may explain why triglycerides still accumulate during insulin resistance, thereby resulting in both hyperglycaemia and hepatic steatosis. One recent study proposes a mechanism by which insulin signalling bifurcates and differentially regulates liver glucose production and SREBP1-c-mediated lipogenesis during insulin resistance. These authors suggest that peripheral insulin resistance causes liver glucose production (through adipose tissue lipolysis) while autonomous insulin signalling remains active and is still able to stimulate SREBP1-c activity and lipogenesis.⁷²⁻⁷⁴ These results raise the question of how insulin regulates

SREBP1-c during pathological insulin resistance and what is the contribution of SREBP1-c and ChREBP to the development of hepatic steatosis during insulin resistance.

PPAR α : a lipid metabolism regulator in the liver

PPAR α is a transcription factor of the nuclear receptor family. It is highly expressed in hepatocytes where it plays a crucial role in controlling lipid transport and metabolism, especially through activation of mitochondrial and peroxisomal fatty acid β -oxidation pathways.⁷⁵ PPAR α is particularly active during fasting, as it controls fatty acid catabolism and ketogenesis,⁷⁶⁻⁷⁸ as well as the endocrine hormone FGF21.^{79,80} Several lines of evidence from

Table 2. Overview of the current pharmacological agents for the treatment of NAFLD/NASH.

| Drug | Mechanism/target | Clinical improvements | | | | | Current phase |
|---|----------------------------------|-----------------------|-----------|------|-----------|----------|------------------|
| | | IR | Steatosis | NASH | Apoptosis | Fibrosis | |
| Therapies targeting insulin resistance and de novo lipogenesis | | | | | | | |
| Obeticholic acid | FXR agonist | | ● | ● | | ● | III |
| Cilofexor (GS-9674) | FXR agonist | | ● | | | | II |
| Tropifexor | Non-steroidal FXR agonist | | ● | ● | | | II |
| Firsocostat (GS-0976) | ACC inhibitor | | ● | ● | | ● | II |
| Cilofexor + firsocostat | FXR agonist + ACC inhibitor | ● | ● | ● | | ● | II |
| TVB-2640 | FASN inhibitor | | ● | | | | II |
| Aramchol | SCD1 inhibitor | | ● | ● | | | III |
| Pradigastat | DGAT1 inhibitor | | ● | | | | II |
| Elafibranor | PPAR α / β agonist | | | ● | | | III ¹ |
| Seladelpar (MBX-8025) | PPAR δ agonist | ● | | | | | II ² |
| Saroglitazar | PPAR α / γ agonist | | | ● | | | II |
| 25-hydroxycholesterol3-sulfate | LXR inhibitor | | ● | ● | | ● | I |
| Pegbelfermin (BMS-986036) | FGF21 analogue | | ● | | | | II |
| NGM-282 | FGF19 analogue | | ● | ● | | ● | II |
| Ursodeoxycholic acid (UDCA) | Bile acid | | ● | ● | | | II |
| Therapies targeting apoptosis | | | | | | | |
| Emricasan | Caspase inhibitor | | | ● | ● | ● | II ³ |
| Selonsertib | ASK1 inhibitor | | ● | ● | | ● | III ⁴ |
| Simtuzumab | Antibody against LOXL2 | | ● | ● | | ● | II |
| Selonsertib + simtuzumab | | | ● | ● | | ● | II |
| Therapies targeting fibrosis | | | | | | | |
| Cenicriviroc | CCR2/5 antagonist | ● | | | | ● | III ⁵ |
| Belapectin (GR-MD-02) | Galactin-3 inhibitor | | | ● | | ● | II |

ACC, acetyl-coA carboxylase; ASK1, apoptosis signal-regulating kinase 1; CCR2/5, C-C chemokine receptor type 2/5; DGAT1, diacylglycerol acyltransferase 1; FASN, fatty acid synthase; FGF21, fibroblast growth factor 21; FXR, farnesoid X receptor; IR, insulin resistance; LOXL2, lysyl oxidase-like 2; LXR, liver X receptor; PPAR, peroxisome proliferative activated receptor; SCD1, steroyl-coA desaturase 1.

¹ Phase III has been stopped because elafibranor failed to reach the primary endpoint

² Phase IIb trial had to be halted after the appearance of liver cell damage and signs of inflammation in some participants.

³ Phase II trials of emricasan failed to reach their primary endpoints.

⁴ Phase III trial of selonsertib failed to reach its primary endpoint.

⁵ Phase III trial of cenicriviroc was terminated early due to a lack of efficacy.

studies in mice also suggest that PPAR α may protect against steatosis and inflammation.^{77,81-84} PPAR α is highly activated upon binding of ligands. It has been shown to be activated by fatty acids and eicosanoids⁸⁵⁻⁸⁸ as well as other lipids such as phospholipids⁸⁹ and endocannabinoids.^{90,91}

Fibrates are pharmacological ligands of PPAR α known as lipid-lowering agents; they are currently used in humans to treat dyslipidaemia and hypertriglyceridaemia.⁹² They have demonstrated many hepatic benefits in preclinical studies (improvement of hepatic steatosis, inflammation and fibrosis),^{93,94} but these results were not replicated in humans, thereby limiting their use to the treatment of dyslipidaemia rather than NAFLD and NASH.

Previous studies reported a relationship between lower expression of PPAR α and progression of fibrosis in human liver tissue, thus justifying the study of fibrates and PPAR-targeted treatments in the context of liver diseases.⁹⁵ Moreover, PPAR α has anti-inflammatory properties as it enhances FGF21 activity and reduces NF- κ B activity.⁹⁶ These findings indicate that PPAR α represents an interesting target in NAFLD since it regulates key metabolic pathways in the liver and correlates negatively with liver diseases in humans. However, while PPAR α -targeted treatments have shown efficacy for NAFLD in preclinical studies, their effects in humans remain controversial; hence, further studies are required before they can be considered as candidates for the treatment of NAFLD.

New metabolic/pharmacological targets

As mentioned, there are currently no drugs that can cure or treat NAFLD; thus, pharmacological research in the field of NAFLD is extremely active with different pathways being targeted: insulin resistance and gluconeogenesis, lipid transport and lipogenesis, apoptosis, oxidative stress and inflammation, extracellular matrix deposition and fibrosis (Fig. 2). The most important histological determinant in NASH is fibrosis since it has been demonstrated that it is the major driver of cardiovascular comorbidity, malignancy and mortality in NASH.⁹⁷ Thereafter, antifibrotic therapeutics are a central focus in NASH drug research.

In summary, an ideal drug candidate for NAFLD should improve steatosis, hepatic inflammation and fibrosis, while ameliorating glucose metabolism, insulin resistance and obesity. The molecules currently being studied for NASH are innumerable and the purpose of this review is not to describe all of them but to give preliminary results on the main classes (Table 2).

Targeting insulin resistance and de novo lipogenesis

FXR agonists

The farnesoid X receptor (FXR) is a crucial molecular actor in hepatic homeostasis. The activation of FXR reduces lipotoxicity (by inactivating the *de novo* lipogenesis mediated by SREBP-1c), increases mitochondrial β -oxidation and increases cholesterol

excretion, thus resulting in reduced insulin resistance, inflammation and fibrosis. The first clinical study published in 2015, the FLINT trial, reported that treatment for 72 weeks with obeticholic acid, a semisynthetic bile acid FXR agonist, improved necro-inflammation without worsening fibrosis in 46% of patients with histologically proven NASH and led to NASH resolution in 22% of treated patients. The FLINT study was the first to demonstrate that FXR activity appears to be a potent target, not only for improving lipid metabolism, but also for some histological alterations in NASH and laid the foundation for a long-term phase III trial.⁹⁸ In a recently published multicentre, randomised, placebo-controlled study, 931 patients with intermediate hepatic fibrosis (F2-F3) were randomised to placebo, 10 mg and 25 mg of obeticholic acid for 18 months (interim analysis). The primary endpoint of fibrosis improvement was achieved by 12% of the placebo group, 18% of the study group treated with 10 mg of obeticholic acid ($p = 0.045$) and 23% of patients treated with 25 mg of obeticholic acid ($p = 0.0002$), respectively. The secondary endpoint of NASH resolution was not met and the impact on insulin resistance was not evaluated in this trial. The most common adverse events were pruritus, a transient increase in total cholesterol and LDL-cholesterol, and a decrease in HDL-cholesterol. Long-term clinical outcomes are being assessed in a long-term phase III trial.⁹⁹ There are other non-steroidal FXR agonists (Px-102, Px-104, LMB763, Gs-9674) that are being studied in phase I-IIa randomised controlled trials (RCTs) in patients with NASH. In the FLIGHT-FXR phase II study, tropifexor treatment efficiently decreased steatosis and reduced circulating alanine aminotransferase and GGT levels (NCT02855164).¹⁰⁰ Other FXR agonists currently investigated include cilofexor (NCT03449446), EDP-305 (NCT03421431), EYP 001 (NCT03812029) and nidufexor (NCT02913105). The ATLAS trial, a phase II, randomised, double-blind, placebo-controlled study (NCT03449446), evaluated the safety and efficacy of monotherapy and dual combination regimens of cilofexor 30 mg, firsocostat 20 mg (an ACC inhibitor) and selonsertib 18 mg in patients with advanced fibrosis, including those with NASH-related cirrhosis. In this study, 392 patients were enrolled (56% had compensated cirrhosis) and a numerically higher percentage of patients in the combination therapy group (cilofexor and firsocostat) achieved a ≥ 1 stage improvement in fibrosis without worsening of NASH after 48 weeks of treatment compared with the placebo group (20.9% vs. 10.5%, $p = 0.17$), respectively.¹⁰¹ The ATLAS trial exemplifies efforts to use FXR agonists (cilofexor) at a lower dose, with an ACC inhibitor (firsocostat) in order to reduce side effects related to FXR agonism. Norursodeoxycholic acid, a bile acid derivative like other FXR agonists led to a dose-dependent reduction in serum transaminases in a double-blind randomised, placebo-controlled phase II trial without liver histology (NCT03872921).¹⁰²

Acetyl-coenzyme A carboxylase inhibition

ACC promotes the adenosine triphosphatase-dependent carboxylation of acetyl-CoA to malonyl-CoA, the first rate-limiting step in *de novo* lipogenesis.¹⁰³ The ACC-1 isoenzyme has a cytosolic localisation and is expressed in hepatocytes and adipocytes, while the ACC-2 isoenzyme is expressed on the mitochondrial surface of oxidative tissues such as the liver, heart, and skeletal muscle.¹⁰³ The inhibition of ACC decreases *de novo*

lipogenesis and increases FA β -oxidation,¹⁰³ indeed mice with constitutively active ACC exhibit hepatic insulin resistance and increased *de novo* lipogenesis, developing NASH with progressive liver fibrosis. This phenotype is prevented by the genetic ablation of ACC or its pharmacological inhibition.¹⁰⁴ GS-0976, an oral treatment currently being evaluated in a phase IIa RCT, is an inhibitor of hepatic ACC-1 and ACC-2, which leads to a reduction of steatosis, suppression of *de novo* lipogenesis and a reduction of serum fibrosis markers in non-cirrhotic patients with NASH. Nausea, abdominal pain, diarrhoea, headache and the asymptomatic increase of serum triglycerides were the most common adverse events associated with GS-0976, which did not impact on insulin resistance.¹⁰⁵

Firsocostat, an ACC inhibitor, led to a 29% reduction of liver fat content in 126 patients with NASH when given at a dose of 20 mg daily for 12 weeks in a phase II trial (NCT02856555).¹⁰⁶

FASn inhibition

FASn is one of the enzymes involved in *de novo* lipogenesis in the liver. In a phase II randomised, placebo-controlled trial, 99 patients with NASH were given 25 mg or 50 mg of TVB 2640 (FASn inhibitor) or placebo per day. Liver fat was measured by MRI.

Patients on the lower and higher dose showed a 9.6% and 25% reduction of liver fat content, respectively, compared to a 4.5% increase in the placebo group.¹⁰⁷ Safety monitoring revealed that this drug was well tolerated, without an increase in plasma triglycerides. Alopecia occurred in 2 patients (reversed after stopping the drug), but otherwise no changes were observed in fasting glucose, insulin, ketones, and renal function. A larger phase IIb clinical trial in patients with NASH and stage 2-3 fibrosis is expected to start in the first half of 2021.

SCD1 inhibition

Aramchol is an inhibitor of SCD1, one of the key enzymes of *de novo* lipogenesis. In a phase IIa randomised, double-blind, placebo-controlled trial of 60 patients with a histological diagnosis of NAFLD, aramchol (300 mg/day for 12 weeks) reduced liver fat (measured with MR spectroscopy) by 12.6% (vs. an increase of 6.4% in the placebo group).¹⁰⁸ These results led to a phase IIb study (ARREST) where patients were randomised to 400 or 600 mg/day of aramchol or placebo. The 400 mg group showed a significant reduction of liver fat content ($p = 0.045$) and a trend was observed in the 600 mg group ($p = 0.066$) compared with placebo. Resolution of NASH without worsening of fibrosis was more frequent in the 600 mg group than in the placebo group (16.7% vs. 5%, odds ratio = 4.74; $p = 0.0514$).¹⁰⁹ However, while no improvement in insulin resistance was observed, glycated haemoglobin was reduced. No severe side effects were observed in this study. Currently a phase III study is ongoing (NCT04104321).

Diaclyglycerol acyltransferase 1 and 2 inhibition

Diaclyglycerol acyltransferase (DGAT) is the enzyme that catalyses the last reaction in triglyceride synthesis and diglyceride esterification by long-chain acyl-CoA esters. There are 2 isoforms: DGAT-1 is expressed in enterocytes of the small intestine, where it reassembles triglycerides from dietary FAs to form chylomicrons,¹⁰³ while DGAT-2 is present in the liver, skin and adipose tissue, where it synthesises triglycerides from *de novo* FFAs and diglycerides.¹¹⁰ DGAT-1^{KO} mice are viable and show a

reduction of tissue triglycerides, while DGAT-2^{KO} mice are not viable since they develop severe serum lipid reduction and have impaired skin barrier function.¹¹¹ It has been reported that dietary SFA absorption is increased in patients with NASH,¹¹² which has led investigators to evaluate selective DGAT-1 inhibitors for the treatment of NASH, obesity and hyperlipidaemia. The first molecule studied in humans, pradigastat, decreased liver steatosis (assessed by MRI) in about 24 weeks but it was associated with diarrhoea and steatorrhea in almost 90% of patients.¹¹³ Abdominal pain, diarrhoea and headache were the most common adverse events, while no improvement in insulin resistance was reported with DGAT-1 inhibitors.

More recent data show that selective hepatic DGAT-2 inhibition decreases lipidic hepatic accumulation in HFD-fed animal models, moreover, it improves insulin resistance though the downregulation of SREBP-1c-mediated *de novo* lipogenesis and it reduces NF- κ B-mediated inflammation and fibrogenesis.^{114–116}

PPAR agonists

PPAR α , β/δ and γ isotypes are involved in glucose and lipid metabolism as well as inflammation and fibrosis, which makes them pharmacological targets in the field of NAFLD and NASH.^{117,118} While there are substantial preclinical links between PPAR and NAFLD, the most promising results of clinical trials came from pan-agonist targeting of at least 2 PPAR isotypes. Experimental models show an improvement of NASH and a reduction of liver fibrosis after PPAR α and β/δ stimulation.¹¹⁹ In a phase IIb RCT, elafibranor, a PPAR α and PPAR β/δ agonist, ameliorated serum lipid profile and insulin resistance and improved NASH without worsening fibrosis.¹²⁰ This has not yet been confirmed in phase III but the data are not fully released.¹²¹

Saroglitazar, a predominant PPAR α and moderate PPAR γ agonist, and lanifibranor, a pan-PPAR agonist improved diet-induced NASH by upregulating β -oxidation and FA desaturation.^{122,123} Saroglitazar was also reported to improve liver enzymes, liver fat content, insulin resistance and atherogenic dyslipidaemia in participants with NAFLD/NASH.¹²⁴ While promising, larger trials over longer durations, with more extensive analysis of efficacy and safety, are required.

LXR α modulation

Liver X receptor (LXR α) is an important regulator of FFA and cholesterol metabolism through the activation of SREBP-1c. LXR α promotes *de novo* lipogenesis and reduces LDL catabolism, favouring hepatic steatosis. LXR α activation also induces intestinal excretion of cholesterol and increases its conversion into bile acids by stimulating the expression of cytochrome P450 7A1, the rate-limiting enzyme in bile acid synthesis. A recent study reported that LXR α inhibition by 25-hydroxycholesterol-3-sulfate had anti-inflammatory, anti-steatotic and antifibrotic effects in mouse models of NASH.¹²⁵ The effects of this class of molecules on insulin resistance are still debated.¹²⁶ In a clinical trial, 25-hydroxycholesterol-3-sulfate was proven to be safe in a phase Ib study in patients with NASH (clinicaltrials.gov numbers ACTRN12615001355561).

FGF21 agonist

FGF21 is produced by the liver, adipose tissue and pancreas. FGF21 exerts several beneficial metabolic effects: it increases energy expenditure, reduces sugar intake, stimulates β -oxidation, increases the production of adiponectin and improves

insulin resistance.⁸⁰ Pegbelfermin, a pegylated FGF21 analogue, administered for 16 weeks to patients with NASH, decreased hepatic steatosis (evaluated by MRI) in a phase II study (NCT02413372).¹²⁷ The efficacy and safety of pegbelfermin, which has to be injected subcutaneously, are currently being investigated in phase IIb clinical trials: FALCON 1 (NCT03486899) in patients with NASH with bridging fibrosis; and FALCON 2 (NCT03486912) in those with NASH and compensated cirrhosis.

FGF19 agonist

Fibroblast growth factor (FGF)19 is released after the activation of intestinal FXR, with similar downstream effects as those noted following FXR activation. NGM282 is a humanised analogue of FGF19, which acts on the same pathway as intestinal FXR agonists.¹²⁸ In a multicentre open label trial of NGM282, patients received subcutaneous NGM282 at 1 or 3 mg with paired biopsies at 12 weeks (n = 43).¹²⁹ NGM282 at 3 mg decreased fibrosis by ≥ 1 stage without NASH worsening in 42% of patients and improved NAS by ≥ 2 points without fibrosis worsening in 63% of patients. A 24-week phase IIb trial of NGM282 for the treatment of NASH is currently underway (NCT03912532).

Targeting apoptosis

Apoptosis has been shown to contribute to liver injury in NASH. The final reaction of cell death is mediated by caspases. In a recent study, a pan-caspase inhibitor emricasan was administered alongside regular chow or HFD in a murine model of NASH. Mice fed with HFD and treated with emricasan had a reduction of apoptosis, an improvement of serum transaminases, a reduction of liver inflammation and fibrosis (evaluated with the NAS score) and serum markers of inflammation such as IL-1 β and TNF- α .¹³⁰ However, emricasan did not show the same positive effects in 2 studies in humans. In a double blind, placebo-controlled study, 318 patients with NASH and stage F1–F3 fibrosis were randomised to twice-daily treatment with emricasan (5 or 50 mg) or matching placebo for 72 weeks. In this negative trial, emricasan treatment did not improve liver histology and may have worsened fibrosis and ballooning.¹³¹

In the multicentre double-blinded study, 263 patients with NASH cirrhosis and baseline hepatic venous pressure gradient (HVPG ≥ 12 mmHg) were randomised to twice daily oral emricasan 5 mg, 25 mg, 50 mg or placebo for up to 48 weeks. There were no significant differences in HVPG improvement for any emricasan dose vs. placebo when adjusted for baseline HVPG, compensation status, and non-selective beta-blocker use. Decompensating rate ($\sim 10\%$ over median exposure of 337 days) and liver disease progression were similar between treatment groups.¹³²

Another anti-apoptotic molecule is selonsertib – an inhibitor of apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1). ASK1 is activated by intracellular TNF α and endoplasmic reticulum stress and it goes on to activate the P38/JNK pathway, resulting in cell death.¹³³ An open label phase II trial evaluated the efficacy of selonsertib alone or in combination with simtuzumab in patients with NASH without advanced fibrosis (F2/F3). Simtuzumab is a monoclonal antibody against the enzyme lysyl oxidase-like 2, which is responsible for the cross-linking of collagen and is overexpressed during fibrosis progression.¹³⁴ Given for 24 weeks, selonsertib improved liver fibrosis, liver inflammation and steatosis (evaluated by MRI). There was no difference between selonsertib alone or selonsertib with simtuzumab.¹³⁵

However the phase III trial on selonsertib among patients with histologically proven NASH with stage 3 fibrosis (STELLAR 3) and cirrhosis (STELLAR 4) did not confirm these positive results. Patients were randomised to receive selonsertib 6 mg or 18 mg, or placebo once daily for 48 weeks. The primary endpoint was the proportion of patients with ≥ 1 -stage improvement in fibrosis without worsening of NASH at the end of treatment. Unfortunately, 48 weeks of selonsertib had no antifibrotic effect in patients with stage F3 fibrosis or compensated cirrhosis due to NASH.¹³⁶

Targeting fibrosis

As already mentioned, fibrosis is the most important determinant of mortality in patients with NASH. Thus, several antifibrotic agents have been evaluated for the treatment of NASH with moderate to extensive fibrosis. Cenicriviroc is an antagonist of CCR2/5 (C-C motif chemokine receptor-2/5) that has antifibrotic effects – through the inhibition of migration and activation of collagen-producing HSCs – and improves insulin resistance.¹³⁷ A phase IIb trial (CENTAUR study) reported an improvement of fibrosis without worsening of NASH after 1 year of treatment with cenicriviroc in 20% of patients compared to 10% for placebo. However, this was not supported in a phase III study in patients with grade 2/3 fibrosis, which has been terminated early (AURORA study; NCT03028740).

Another molecule involved in liver fibrosis is galectin-3; in mouse models, GR-MD-02 (belapectin), a galectin-3 inhibitor, improved liver fibrosis, with a reduction of collagen deposition and NASH inflammatory activity.¹³⁸ However, the recently published phase IIb, randomised trial of the safety and efficacy of GR-MD-02 in patients with NASH, cirrhosis, and portal hypertension did not report an improvement of portal hypertension (evaluated by hepatic venous pressure gradient) nor hepatic fibrosis (evaluated by liver biopsy) after 52 weeks of treatment.¹³⁹

Conclusion

NAFLD is a complex disease, involving environmental and genetic factors, whose pathogenesis and progression are not completely understood. In this review we have discussed pre-clinical models and potential mechanisms of liver damage such as glucotoxicity and lipotoxicity. The complete comprehension of these mechanisms will help us to prevent the first hit and the progression of liver disease through effective treatment. Numerous molecules are currently being studied in phase II and III clinical trials and some agents have shown promise in terms of improving steatosis, inflammation and fibrosis.

Abbreviations

ACC, acetyl-CoA carboxylase; ASK1, apoptosis signal-regulating kinase 1; CAP, controlled attenuation parameter; ChREBP, carbohydrate responsive element-binding protein; FAS, fatty acid synthase; FFA, free fatty acid; FGF21, fibroblast growth factor-21; FXR, farnesoid X receptor; GGT, gamma glutamyltransferase; HCC, hepatocellular carcinoma; HFD, high-fat diet; HSC, hepatic stellate cells; HSL, hormone-sensitive lipase; HVPG, hepatic venous pressure gradient; IL-, interleukin-; JNK, c-Jun N-terminal kinase; LXR, liver X receptor; MCD, methionine- and choline-deficient; MUFA, monounsaturated fatty acids; NAFLD, non-alcoholic fatty liver disease; NASH, non-alcoholic steatohepatitis; NEFA, non-esterified fatty acid; PPAR α , peroxisome proliferator-activated receptor- α ; Phf2, histone demethylase plant homeodomain finger 2; PY, persons/years; PUFAs, polyunsaturated fatty acids; RCT, randomised controlled trial; SCD1, stearoyl-CoA desaturase-1; SFA, saturated fatty acid; SREBP-1c, sterol regulatory element-binding protein-1c; TCA, tricarboxylic acid; TLR4, Toll-like receptor 4; TNF- α , tumour necrosis factor- α ; VLDL, very low-density lipoprotein.

Financial support

Lucia Parlati and Catherine Postic received funding from the French association for the study of the liver (AFEF). Catherine Postic and Hervé Guillou received funding from the Agence Nationale de la Recherche (ANR-17-CE14-0015Hepadialogue).

Conflict of interest

LP, MR, HG and CP declare no conflicts of interest that pertain to this work.

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

Authors' contributions

The authors contributed equally for the draft of the article, for the critical revision and for the final approval of the article.

Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.jhepr.2021.100346>.

References

Author names in bold designate shared co-first authorship

- [1] Charlton MR, Burns JM, Pedersen RA, Watt KD, Heimbach JK, Dierkhising RA. Frequency and outcomes of liver transplantation for nonalcoholic steatohepatitis in the United States. *Gastroenterology* 2011;(4):1249–1253. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.06.061>.
- [2] Whalley S, Puvanachandra P, Desai A, Kennedy H. Hepatology outpatient service provision in secondary care: a study of liver disease incidence and resources costs. *Clin Med* 2007;7:119–124. <https://doi.org/10.7861/clinmedicine.7-2-119>.
- [3] **Zelber-Sagi S, Lotan R**, Shlomai A, Webb M, Harrari G, Buch A, et al. Predictors for incidence and remission of NAFLD in the general population during a seven-year prospective follow-up. *J Hepatol* 2012;56:1145–1151. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2011.12.011>.
- [4] Younossi ZM, Koenig AB, Abdelatif D, Fazel Y, Henry L, Wymer M. Global epidemiology on nonalcoholic fatty liver disease—Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology* 2016;64:73–84. <https://doi.org/10.1002/hep.28431>.
- [5] Sung K-C, Wild SH, Byrne CD. Development of new fatty liver or resolution of existing fatty liver, over five years of follow-up, and risk of incident hypertension. *J Hepatol* 2014;60:1040–1045. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2014.01.009>.
- [6] Wong VW, Wong GL, Yeung DK, Lau TK, Chan CK, Chim AM, et al. Incidence of nonalcoholic fatty liver disease in Hong Kong: a population study with paired proton-magnetic resonance spectroscopy. *J Hepatol* 2015;62:182–189. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2014.08.041>.
- [7] Hamaguchi M, Kojima T, Takeda N, Nakagawa T, Taniguchi H, Fujii K, et al. The metabolic syndrome as a predictor of nonalcoholic fatty liver disease. *Ann Intern Med* 2005;143:722–728. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-143-10-200511150-00009>.
- [8] Marchesini G, Mazzotti A. NAFLD incidence and remission: only a matter of weight gain and weight loss. *J Hepatol* 2015;62:15–17. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2014.10.023>.
- [9] Fuentes S, Cosson E, Mandereau-Bruno L, Fagot-Campagna A, Bernillon P, Goldberg M, et al. Identifying diabetes cases in health administrative databases: a validation study based on a large French cohort. *Int J Publ Health* 2019;64(3):441–450. <https://doi.org/10.1007/s00038-018-1186-3>.

- [10] Chalasani N, Younossi Z, Lavine JE, Diehl AM, Brunt EM, Cusi K, et al. The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: practice guideline by the American Gastroenterological Association, American Association for the Study of Liver Diseases, and American College of Gastroenterology. *Gastroenterology* 2012;142:1592–1609. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2012.04.001>.
- [11] Angulo P, Hui JM, Marchesini G, Bugianesi E, George J, Farrell GC, et al. The NAFLD fibrosis score: a noninvasive system that identifies liver fibrosis in patients with NAFLD. *Hepatology* 2007;45:846–854. <https://doi.org/10.1002/hep.21496>.
- [12] Rinella ME. Nonalcoholic fatty liver disease: a systematic review. *JAMA* 2015;313:2263–2273. <https://doi.org/10.1001/jama.2015.5370>.
- [13] Donnelly KL, Smith CI, Schwarzenberg SJ, Jessurun J, Boldt MD, Parks EJ. Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Invest* 2005;115:1343–1351. <https://doi.org/10.1172/JCI23621>.
- [14] Lambert JE, Ramos-Roman MA, Browning JD, Parks EJ. Increased de novo lipogenesis is a distinct characteristic of individuals with nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 2014;146:726–735. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2013.11.049>.
- [15] Fabbrini E, Mohammed BS, Magkos F, Korenblat KM, Patterson BW, Klein S. Alterations in adipose tissue and hepatic lipid kinetics in obese men and women with nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 2008;134:424–431. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2007.11.038>.
- [16] Hodson L, McQuaid SE, Humphreys SM, Milne R, Fielding BA, Frayn KN, et al. Greater dietary fat oxidation in obese compared with lean men: an adaptive mechanism to prevent liver fat accumulation? *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2010;299:E584–E592. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00272.2010>.
- [17] Siiteri PK. Adipose tissue as a source of hormones. *Am J Clin Nutr* 1987;45(1 Suppl):277–282. <https://doi.org/10.1093/ajcn/45.1.277>.
- [18] Angulo P. NAFLD, obesity, and bariatric surgery. *Gastroenterology* 2006;130(6):1848–1852. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2006.03.041>.
- [19] Berg AH, Combs TP, Du X, Brownlee M, Scherer PE. The adipocyte-secreted protein Acrp30 enhances hepatic insulin action. *Nat Med* 2001;7(8):947–953. <https://doi.org/10.1038/90992>.
- [20] Pagano C, Soardo G, Esposito W, Fallo F, Basan L, Donnini D, et al. Plasma adiponectin is decreased in nonalcoholic fatty liver disease. *Eur J Endocrinol* 2005;152:113–118. <https://doi.org/10.1530/eje.1.01821>.
- [21] Argo CK, Northup PG, Al-Osaimi AM, Caldwell SH. Systematic review of risk factors for fibrosis progression in nonalcoholic steatohepatitis. *J Hepatol* 2009;51:371–379. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2009.03.019>.
- [22] Singh S, Allen AM, Wang Z, Prokop LJ, Murad MH, Loomba R. Fibrosis progression in nonalcoholic fatty liver vs nonalcoholic steatohepatitis: a systematic review and meta-analysis of paired-biopsy studies. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2015;13. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2014.04.014>. 643–654. e1–9.
- [23] Adams LA, Lymp JF, St Sauver J, Sanderson SO, Lindor KD, Feldstein A, et al. The natural history of nonalcoholic fatty liver disease: a population-based cohort study. *Gastroenterology* 2005;129(1):113–121. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2005.04.014>.
- [24] White DL, Kanwal F, El-Serag HB. Association between nonalcoholic fatty liver disease and risk for hepatocellular cancer, based on systematic review. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2012;10:1342–1359. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2012.10.001>.
- [25] DePrince A, Haas JT, Staels B. Dysregulated lipid metabolism links NAFLD to cardiovascular disease. *Mol Metab* 2020 Dec;42:101092. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2020.101092>.
- [26] Vilar-Gomez E, Martinez-Perez Y, Calzadilla-Bertot L, Torres-Gonzalez A, Gra-Oramas B, Gonzalez-Fabian L, et al. Weight loss through lifestyle modification significantly reduces features of nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology* 2015;149. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2015.04.005>. 367–378. e5.
- [27] Vargas V, Allende H, Lecube A, Salcedo MT, Baena-Fustegueras JA, Fort JM, et al. Surgically induced weight loss by gastric bypass improves non alcoholic fatty liver disease in morbid obese patients. *World J Hepatol* 2012;4:382–388. <https://doi.org/10.4254/wjh.v4.i12.382>.
- [28] Clark JM, Alkhuraishi AR, Solga SF, Alli P, Diehl AM, Magnuson TH. Roux-en-Y gastric bypass improves liver histology in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Obes Res* 2005;13:1180–1186. <https://doi.org/10.1038/oby.2005.140>.
- [29] Sanyal AJ, Chalasani N, Kowdley KV, McCullough A, Diehl AM, Bass NM, et al. Pioglitazone, vitamin E, or placebo for nonalcoholic steatohepatitis. *N Engl J Med* 2010;362:1675–1685. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0907929>.
- [30] Neuschwander-Tetri BA, Loomba R, Sanyal AJ, Lavine JE, Van Natta ML, Abdelmalek MF, et al. Farnesoid X nuclear receptor ligand obeticholic acid for non-cirrhotic, non-alcoholic steatohepatitis (FLINT): a multicentre, randomised, placebo-controlled trial. *Lancet* 2015;385:956–965. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)61933-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)61933-4).
- [31] Rotman Y, Sanyal AJ. Current and upcoming pharmacotherapy for non-alcoholic fatty liver disease. *Gut* 2017 Jan;66(1):180–190. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2016-312431>.
- [32] Hui Simon T, Parks Brian W, Org Elin, Norheim Frode, Che Nam, Pan Calvin, et al. The genetic architecture of NAFLD among inbred strains of mice. *Elife* 2015 Jun 12;4:e05607. <https://doi.org/10.7554/eLife.05607>.
- [33] Martinov MV, Vitvitsky VM, Banerjee R, Ataulkhanov FI. The logic of the hepatic methionine metabolic cycle. *Biochim Biophys Acta* 2010;1804:89–96. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2009.10.004>.
- [34] Zeisel SH, da Costa KA. Choline: an essential nutrient for public health. *Nutr Rev* 2009;67:615–623. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2009.00246>.
- [35] Fast DG, Vance DE. Nascent VLDL phospholipid composition is altered when phosphatidylcholine biosynthesis is inhibited: evidence for a novel mechanism that regulates VLDL secretion. *Biochim Biophys Acta* 1995;1258:159–168. [https://doi.org/10.1016/0005-2760\(95\)00116-t](https://doi.org/10.1016/0005-2760(95)00116-t).
- [36] Banni S, Corongiu FP, Dessi MA, Iannone A, Lombardi B, Tomasi A, et al. Free radicals and lipid peroxidation in liver of rats kept on a diet devoid of choline. *Free Radic Res Commun* 1989;7:233–240. <https://doi.org/10.3109/10715768909087947>.
- [37] Pierce AA, Pickens MK, Siao K, Grenert JP, Maher JJ. Differential hepatotoxicity of dietary and DNL-derived palmitate in the methionine-choline-deficient model of steatohepatitis. *BMC Gastroenterol* 2015 Jun 24;15:72. <https://doi.org/10.1186/s12876-015-0298-y>.
- [38] Matsumoto M, Hada N, Sakamaki Y, Uno A, Shiga T, Tanaka C, et al. An improved mouse model that rapidly develops fibrosis in non-alcoholic steatohepatitis. *Int J Exp Pathol* 2013;94(2):93–103. <https://doi.org/10.1111/ieip.12008>.
- [39] Hosseini Z, Whiting SJ, Vatanparast H. Current evidence on the association of the metabolic syndrome and dietary patterns in a global perspective. *Nutr Res Rev* 2016;29(2):152–162. <https://doi.org/10.1017/S095442241600007X>.
- [40] Vergnes L, Phan J, Strauss M, Tafuri S, Reue K. Cholesterol and cholate components of an atherogenic diet induce distinct stages of hepatic inflammatory gene expression. *J Biol Chem* 2003;278(44):42774–42784. <https://doi.org/10.1074/jbc.M306022200>.
- [41] Kohli R, Kirby M, Xanthakos SA, Softic S, Feldstein AE, Saxena V, et al. High-fructose, medium chain trans fat diet induces liver fibrosis and elevates plasma coenzyme Q9 in a novel murine model of obesity and nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2010 Sep;52(3):934–944. <https://doi.org/10.1002/hep.23797>.
- [42] Wang D, Wei Y, Pagliassotti MJ. Saturated fatty acids promote endoplasmic reticulum stress and liver injury in rats with hepatic steatosis. *Endocrinology* 2006;147(2):943–951. <https://doi.org/10.1210/en.2005-0570>.
- [43] Asgharpour A, Cazanave SC, Pacana T, Seneshaw M, Vincent R, Banini BA, et al. A diet-induced animal model of non-alcoholic fatty liver disease and hepatocellular cancer. *J Hepatol* 2016;65(3):579–588. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2016.05.005>.
- [44] Tsuchida T, Lee YA, Fujiwara N, Ybanez M, Allen B, Martins S, et al. A simple diet- and chemical-induced murine NASH model with rapid progression of steatohepatitis, fibrosis and liver cancer. *J Hepatol* 2018;69(2):385–395. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2018.03.011>.
- [45] Fujii M, Shibasaki Y, Wakamatsu K, Honda Y, Kawachi Y, Suzuki K, et al. A murine model for non-alcoholic steatohepatitis showing evidence of association between diabetes and hepatocellular carcinoma. *Med Mol Morphol* 2013 Sep;46(3):141–152. <https://doi.org/10.1007/s00795-013-0016-1>.
- [46] Sadi G, Cengiz Baloglu M, Bilgehan Pektaş M. Differential gene expression in liver tissues of streptozotocin-induced diabetic rats in response to resveratrol treatment. *PLoS One* 2015 Apr 23;10(4):e0124968. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0124968>.
- [47] Javor ED, Ghany MG, Cochran EK, Oral EA, DePaoli AM, Premkumar A, et al. Leptin reverses nonalcoholic steatohepatitis in patients with severe lipodystrophy. *Hepatology* 2005;41(4):753–760. <https://doi.org/10.1002/hep.20672>.

- [48] Safar Zadeh E, Lungu AO, Cochran EK, Brown RJ, Ghany MG, Heller T, et al. The liver diseases of lipodystrophy: the long-term effect of leptin treatment. *J Hepatol* 2013;59(1):131–137. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2013.02.007>.
- [49] Trak-Smayra V, Paradis V, Massart J, Nasser S, Jebara V, Fromenty B. Pathology of the liver in obese and diabetic ob/ob and db/db mice fed a standard or high-calorie diet. *Int J Exp Pathol* 2011;92(6):413–421. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2613.2011.00793>.
- [50] Handa P, Morgan-Stevenson V, Maliken BD, Nelson JE, Washington S, Westerman M, et al. Iron overload results in hepatic oxidative stress, immune cell activation, and hepatocellular ballooning injury, leading to nonalcoholic steatohepatitis in genetically obese mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2016;310(2):G117–G127. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00246.2015>.
- [51] Laurence P, Vanessa L, Geoffroy F, Isabelle L. Role of ciliary dysfunction in a new model of obesity and non-alcoholic steatohepatitis: the *foz/foz* mice. *Arch Publ Health* 2014;72(Suppl 1):O7. <https://doi.org/10.1186/2049-3258-72-S1-07>.
- [52] Morigny DL, Boucher J, Arner P, Langin D. Lipid and glucose metabolism in white adipocytes: pathways, dysfunction and therapeutics. *Nat Rev Endocrinol* 2021 Feb 24. <https://doi.org/10.1038/s41574-021-00471-8>.
- [53] Gutiérrez-Juárez R, Pocai A, Mulas C, Ono H, Bhanot S, Monia BP, et al. Critical role of stearyl-CoA desaturase-1 (SCD1) in the onset of diet-induced hepatic insulin resistance. *J Clin Invest* 2006;116(6):1686–1695. <https://doi.org/10.1172/JCI26991>.
- [54] Geidl-Flueck B, Hochuli M, Németh Á, Eberl A, Derron N, Köfeler HC, et al. Fructose- and sucrose- but not glucose-sweetened beverages promote hepatic de novo lipogenesis: a randomized controlled trial. *J Hepatol* 2021 Mar 6. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2021.02.027>. S0168-8278(21)00161-6.
- [55] Topping DL, Mayes PA. Comparative effects of fructose and glucose on the lipid and carbohydrate metabolism of perfused rat liver. *Br J Nutr* 1976 Jul;36(1):113–126. <https://doi.org/10.1079/bjn19760062>. PMID: 181044.
- [56] Musso G, Cassader M, Gambino R. Non-alcoholic steatohepatitis: emerging molecular targets and therapeutic strategies. *Nat Rev Drug Discov* 2016;15:249–274. <https://doi.org/10.1038/nrd.2015.3>.
- [57] Cazanave SC, Wang X, Zhou H, Rahmani M, Grant S, Durrant DE, et al. Degradation of Keap1 activates BH3-only proteins Bim and PUMA during hepatocyte lipoapoptosis. *Cell Death Differ* 2014;21:1303–1312. <https://doi.org/10.1038/cdd.2014.49>.
- [58] Win S, Than TA, Zhang J, Oo C, Min RWM, Kaplowitz N. New insights into the role and mechanism of c-Jun-N-terminal kinase signaling in the pathobiology of liver diseases. *Hepatology* 2018;67:2013–2024. <https://doi.org/10.1002/hep.29689>.
- [59] Dentin R, Denechaud PD, Benhamed F, Girard J, Postic C. Hepatic gene regulation by glucose and polyunsaturated fatty acids: a role for ChREBP. *J Nutr* 2006;136(5):1145–1149. <https://doi.org/10.1093/jn/136.5.1145>.
- [60] Guinez C, Filhoulaud G, Rayah-Benhamed F, Marmier S, Dubuquoy C, Dentin R, et al. O-GlcNAcylation increases ChREBP protein content and transcriptional activity in the liver. *Diabetes* 2011;60(5):1399–1413. <https://doi.org/10.2337/db10-0452>.
- [61] Iizuka K, Bruick RK, Liang G, Horton JD, Uyeda K. Deficiency of carbohydrate response element-binding protein (ChREBP) reduces lipogenesis as well as glycolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004 May 11;101(19):7281–7286. <https://doi.org/10.1073/pnas.0401516101>.
- [62] Zhang D, Tong X, Van Dommelen K, Gupta N, Stamper K, Brady GF, et al. Lipogenic transcription factor ChREBP mediates fructose-induced metabolic adaptations to prevent hepatotoxicity. *J Clin Invest* 2017;127:2855–2867. <https://doi.org/10.1172/JCI89934>.
- [63] Kato T, Iizuka K, Takao K, Horikawa Y, Kitamura T, Takeda J. ChREBP-knockout mice show sucrose intolerance and fructose malabsorption. *Nutrients* 2018;10:E340. <https://doi.org/10.3390/nu10030340>.
- [64] Dentin R, Benhamed F, Hainault I, Fauveau V, Fougelle F, Dyck JRB, et al. Liver-specific inhibition of ChREBP improves hepatic steatosis and insulin resistance in ob/ob mice. *Diabetes* 2016;55:2159–2170. <https://doi.org/10.2337/db06-0200>.
- [65] Benhamed F, Denechaud PD, Lemoine M, Robichon C, Moldes M, Bertrand-Michel J, et al. The lipogenic transcription factor ChREBP dissociates hepatic steatosis from insulin resistance in mice and humans. *J Clin Invest* 2012;122(6):2176–2194. <https://doi.org/10.1172/JCI41636>.
- [66] Bricambert J, Alves-Guerra MC, Esteves P, Prip-Buus C, Bertrand-Michel J, Guillou H, et al. The histone demethylase Phf2 acts as a molecular checkpoint to prevent NAFLD progression during obesity. *Nat Commun* 2018 May 29;9(1):2092. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04361-y>. 303
- [67] Foretz M, Guichard C, Ferré P, Fougelle F. Sterol regulatory element binding protein-1c is a major mediator of insulin action on the hepatic expression of glucokinase and lipogenesis-related genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999 Oct 26;96(22):12737–12742. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.22.12737>.
- [68] Yabe D, Komuro R, Liang G, Goldstein JL, Brown MS. Liver-specific mRNA for Insig-2 down-regulated by insulin: implications for fatty acid synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003 Mar 18;100(6):3155–3160. <https://doi.org/10.1073/pnas.0130116100>.
- [69] Biddinger SB, Hernandez-Ono A, Rask-Madsen C, Haas JT, Alemán JO, Kotliansky V, et al. Hepatic insulin resistance is sufficient to produce dyslipidemia and susceptibility to atherosclerosis. *Cell Metab* 2008 Feb;7(2):125–134. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2007.11.013>.
- [70] Shimomura I, Bashmakov Y, Ikemoto S, Horton JD, Brown MS, Goldstein JL. Insulin selectively increases SREBP-1c mRNA in the livers of rats with streptozotocin-induced diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999 Nov 23;96(24):13656–13661. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.24.13656>.
- [71] Moon YA, Liang G, Xie X, Frank-Kamenetsky M, Fitzgerald K, Kotliansky V, et al. The Scap/SREBP pathway is essential for developing diabetic fatty liver and carbohydrate-induced hypertriglyceridemia in animals. *Cell Metab* 2012 Feb 8;15(2):240–246. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.12.017>.
- [72] Cheng Z, White MF. The AKTion in non-canonical insulin signaling. *Nat Med* 2012 Mar 6;18(3):351–353. <https://doi.org/10.1038/nm.2694>.
- [73] Titchenell PM, Quinn WJ, Lu M, Chu Q, Lu W, Li C, et al. Direct hepatocyte insulin signaling is required for lipogenesis but is dispensable for the suppression of glucose production. *Cell Metab* 2016 Jun 14;23(6):1154–1166. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.04.022>.
- [74] Titchenell PM, Chu Q, Monks BR, Birnbaum MJ. Hepatic insulin signalling is dispensable for suppression of glucose output by insulin in vivo. *Nat Commun* 2015 May 12;6:7078. <https://doi.org/10.1038/ncomms8078>.
- [75] Kersten S. Integrated physiology and systems biology of PPAR α . *Mol Metab* 2014 Mar 6;3(4):354–371. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2014.02.002>. eCollection 2014 Jul.
- [76] Kersten S, Seydoux J, Peters JM, Gonzalez FJ, Desvergne B, Wahli W. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha mediates the adaptive response to fasting. *J Clin Invest* 1999 Jun;103(11):1489–1498. <https://doi.org/10.1172/JCI6223>.
- [77] Montagner A, Polizzi A, Fouché E, Ducheix S, Lippi Y, Lasserre F, et al. Liver PPAR α is crucial for whole-body fatty acid homeostasis and is protective against NAFLD. *Gut* 2016;65(7):1202–1214. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2015-310798>.
- [78] Régnier M, Arnaud P, Lippi Y, Fouché E, Michel G, Lukowicz C, et al. Insights into the role of hepatocyte PPAR α activity in response to fasting. *Mol Cell Endocrinol* 2018 Aug 15;471:75–88. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2017.07.035>. Epub 2017 Jul 31.
- [79] Takeshi I, Dutchak P, Guixiang Z, Xunshan D, Laurent G, Vinay P, et al. Endocrine regulation of the fasting response by PPAR α -mediated induction of fibroblast growth factor 21. *Cell Metab* 2007 Jun;5(6):415–425. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2007.05.003>.
- [80] Badman MK, Pissios P, Kennedy AR, George K, Flier JS, Maratos-Flier E. Hepatic fibroblast growth factor 21 is regulated by PPAR α and is a key mediator of hepatic lipid metabolism in ketotic states. *Cell Metab* 2007 Jun;5(6):426–437. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2007.05.002>.
- [81] Pawlak M, Lefebvre P, Staels B. Molecular mechanism of PPAR α action and its impact on lipid metabolism, inflammation and fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol* 2015;62(3):720–733. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2014.10.039>.
- [82] Abdelmegeed MA, Yoo SH, Henderson LE, Gonzalez FJ, Woodcroft KJ, Song BJ. PPAR α expression protects male mice from high fat-induced nonalcoholic fatty liver. *J Nutr* 2011 Apr 1;141(4):603–610. <https://doi.org/10.3945/jn.110.135210>.
- [83] Régnier M, Arnaud P, Smati S, Lukowicz C, Fougerat A, Lippi Y, et al. Hepatocyte-specific deletion of Ppar α promotes NAFLD in the context of obesity. *Sci Rep* 2020 Apr 16;10(1):6489. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-63579-3>.
- [84] Smati S, Polizzi A, Fougerat A, Ellero-Simatos S, Blum Y, Lippi Y, et al. Integrative study of diet-induced mouse models of NAFLD identifies PPAR α as a sexually dimorphic drug target. *Gut* 2021 Apr 26. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2020-323323>. gutjnl-2020-323323.
- [85] Forman BM, Chen J, Evans RM. Hypolipidemic drugs, polyunsaturated fatty acids, and eicosanoids are ligands for peroxisome proliferator-activated receptors alpha and delta. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997 Apr 29;94(9):4312–4317. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.9.4312>.

- [86] Kliewer SA, Sundseth SS, Jones SA, Brown PJ, Wisely GB, Koble CS, et al. Fatty acids and eicosanoids regulate gene expression through direct interactions with peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997 Apr 29;94(9):4318–4323. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.9.4318>.
- [87] Krey G, Braissant O, L'Horsset F, Kalkhoven E, Perroud M, Parker MG, et al. Fatty acids, eicosanoids, and hypolipidemic agents identified as ligands of peroxisome proliferator-activated receptors by coactivator-dependent receptor ligand assay. *Mol Endocrinol* 1997 Jun;11(6):779–791. <https://doi.org/10.1210/mend.11.6.0007>.
- [88] Narala VR, Adapala RK, Suresh MV, Brock TG, Peters-Golden M, Reddy RC. Leukotriene B4 is a physiologically relevant endogenous peroxisome proliferator-activated receptor-alpha agonist. *J Biol Chem* 2010;285:22067–22074. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.085118>.
- [89] Chakravarthy Manu V, Lodhi Irfan J, Yin Li, Malapaka Raghu RV, Xu H Eric, Turk John, et al. Identification of a physiologically relevant endogenous ligand for PPARalpha in liver. *Cell* 2009 Aug 7;138(3):476–488. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.05.036>. Epub 2009 Jul 30.
- [90] Guzmán M, Lo Verme J, Fu J, Oveisi F, Blázquez C, Piomelli D. Oleoylethanolamide stimulates lipolysis by activating the nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR-alpha). *J Biol Chem* 2004 Jul 2;279(27):27849–27854. <https://doi.org/10.1074/jbc.M404087200>. Epub 2004 Apr 26.
- [91] Chen L, Li L, Chen J, Li L, Zheng Z, Ren J, et al. Oleoylethanolamide, an endogenous PPAR- α ligand, attenuates liver fibrosis targeting hepatic stellate cells. *Oncotarget* 2015;6:42530–42540. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.6466>.
- [92] Okopień B, Bułdak Ł, Bóldys A. Benefits and risks of the treatment with fibrates—a comprehensive summary. *Expert Rev Clin Pharmacol* 2018 Nov;11(11):1099–1112. <https://doi.org/10.1080/17512433.2018.1537780>.
- [93] Ip E, Farrell GC, Robertson G, Hall P, Kirsch R, Leclercq I. Central role of PPARalpha-dependent hepatic lipid turnover in dietary steatohepatitis in mice. *Hepatology* 2003 Jul;38(1):123–132. <https://doi.org/10.1053/jhep.2003.50307>.
- [94] Ip E, Farrell G, Hall P, Robertson G, Leclercq I. Administration of the potent PPARalpha agonist, Wy-14,643, reverses nutritional fibrosis and steatohepatitis in mice. *Hepatology* 2004 May;39(5):1286–1296. <https://doi.org/10.1002/hep.20170>.
- [95] Francque S, Verrijken A, Caron S, Prawitt J, Paumelle R, Derudas B, et al. PPAR α gene expression correlates with severity and histological treatment response in patients with non-alcoholic steatohepatitis. *J Hepatol* 2015;63:164–173. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2015.02.019>.
- [96] Staels B, Koenig W, Habib A, Merval R, Lebret M, Torra IP, et al. Activation of human aortic smooth-muscle cells is inhibited by PPARalpha but not by PPARgamma activators. *Nature* 1998;393:790–793. <https://doi.org/10.1038/31701>.
- [97] Angulo P, Kleiner DE, Dam-Larsen S, Adams LA, Bjornsson ES, Charatcharoenwithaya P, et al. Liver fibrosis, but no other histologic features, is associated with long-term outcomes of patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 2015;149:389–397. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2015.04.043>.
- [98] Schonewille M, de Boer JF, Groen AK. *Curr Opin Lipidol* 2016 Jun;27(3):295–301. <https://doi.org/10.1097/MOL.0000000000000303>.
- [99] Younossi ZM, Ratziu V, Loomba R, Rinella M, Anstee QM, Goodman Z, et al. REGENERATE Study Investigators. Obeticholic acid for the treatment of non-alcoholic steatohepatitis: interim analysis from a multicentre, randomised, placebo-controlled phase 3 trial. *Lancet* 2019 Dec 14;394(10215):2184–2196. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)33041-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)33041-7). Epub 2019 Dec 5. Erratum in: *Lancet*. 2020 Aug 1;396(10247):312.
- [100] Tropifexor SA. A highly potent FXR agonist, produces robust and dose-dependent reductions in hepatic fat and serum alanine aminotransferase in patients with fibrotic NASH after 12 weeks of therapy: FLIGH-FXR part C interim results. *Hepatology* 2019;70.
- [101] Press release: Gilead Announces Topline results from phase 2 atlas study in patients with bridging fibrosis (F3) and compensated cirrhosis (F4) due to nonalcoholic steatohepatitis. NASH; 2019.
- [102] Traussnigg S, Schattenberg JM, Demir M, Wjiegand J, Geier A, Teuber G, et al. Norursodeoxycholic acid versus placebo in the treatment of non-alcoholic fatty liver disease: a double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 2 dose-finding trial. *Lancet Gastroenterol Hepatol* 2019;4:781–793. [https://doi.org/10.1016/S2468-1253\(19\)30184-0](https://doi.org/10.1016/S2468-1253(19)30184-0).
- [103] Musso G, Gambino R, Cassader M. Recent insights into hepatic lipid metabolism in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Prog Lipid Res* 2009;48:1–26. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2008.08.001>.
- [104] Harriman G, Greenwood J, Bhat S, Huang X, Wang R, Paul D, et al. Acetyl-CoA carboxylase inhibition by ND-630 reduces hepatic steatosis, improves insulin sensitivity, and modulates dyslipidemia in rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2016 Mar 29;113(13):E1796–E1805. <https://doi.org/10.1073/pnas.1520686113>.
- [105] Lawitz EJ, Poordad F, Coste A, Loo N, Djedjos CS, McColgan B, et al. Acetyl-CoA carboxylase (ACC) inhibitor GS-0976 leads to suppression of hepatic de novo lipogenesis and significant improvements in MRI-PDFF, MRE, and markers of fibrosis after 12 weeks of therapy in patients with NASH. *J Hepatol* 2017;66(Suppl 1):S34. [https://doi.org/10.1016/S0168-8278\(17\)30328-8](https://doi.org/10.1016/S0168-8278(17)30328-8).
- [106] Loomba R, Kayali Z, Nouredin M, Ruane P, Lawitz EJ, Bennett M, et al. SA GS-0976 reduces hepatic steatosis and fibrosis markers in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 2018 Nov;155(5):1463–1473.e6.
- [107] Loomba R, et al. AASLD. 2020 (13–16 November 2020), Abst. 0067.
- [108] Safadi R, Konikoff FM, Mahamid M, Zelber-Sagi S, Halpern M, Gilat T, et al. The fatty acid-bile acid conjugate Aramchol reduces liver fat content in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2014;12(12):2085–2091.e2081.
- [109] Ratziu V, de Guevara L, Safadi R, Poordad F, Fuster F, Flores-Figueroa J, et al. One-year results of the global phase 2b randomized placebo-controlled ARREST trial of aramchol, a stearyl CoA desaturase modulator in NASH patients. San Francisco: AASLD; 2018. Paper presented at the Conference Abstract.
- [110] Irshad Z, Dimitri F, Christian M, Zammit VA. Diacylglycerol acyltransferase 2 links glucose utilization to fatty acid oxidation in the brown adipocytes. *J Lipid Res* 2017;58:15–30. <https://doi.org/10.1194/jlr.M068197>.
- [111] Stone SJ, Myers HM, Watkins SM, Brown BE, Feingold KR, Elias PM, et al. Lipopenia and skin barrier abnormalities in DGAT2-deficient mice. *J Biol Chem* 2004;279:11767–11776. <https://doi.org/10.1074/jbc.M311000200>.
- [112] Utsunomiya H, Yamamoto Y, Takeshita E, Tokumoto Y, Tada F, Miyake T, et al. Upregulated absorption of dietary palmitic acids with changes in intestinal transporters in non-alcoholic steatohepatitis (NASH). *J Gastroenterol* 2017;52(8):940–954. <https://doi.org/10.1007/s00535-016-1298-6>.
- [113] Sanyal AJ, Cusi K, Patel S, Wright M, Liu C, Keefe DL, et al. Effect of pradigast, a diacylglycerol acyltransferase 1 inhibitor, on liver fat content in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2015;62(Suppl 1):1253A.
- [114] Li C, Li L, Lian J, Watts R, Nelson R, Goodwin B, et al. Roles of Acyl-CoA: diacylglycerol acyltransferases 1 and 2 in triacylglycerol synthesis and secretion in primary hepatocytes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2015;35:1080–1091. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.114.304584>.
- [115] Toriumi K, Horikoshi Y, Yoshiyuki Osamura R, Yamamoto Y, Nakamura N, et al. Carbon tetrachloride-induced hepatic injury through formation of oxidized diacylglycerol and activation of the PKC/NF-kB pathway. *Lab Invest* 2013;93:218–229. <https://doi.org/10.1038/labinvest.2012>.
- [116] Takekoshi S, Kitatani K, Yamamoto Y. Roles of oxidized diacylglycerol for carbon tetrachloride-induced liver injury and fibrosis in mouse. *Acta Histochem Cytochem* 2014;47:185–194. <https://doi.org/10.1267/ahc.14030>.
- [117] Fougerat A, Montagner A, Loiseau N, Guillou H, Walter W. Peroxisome proliferator-activated receptors and their novel ligands as candidates for the treatment of non-alcoholic fatty liver disease. *Cells* 2020 Jul 8;9(7):1638. <https://doi.org/10.3390/cells9071638>.
- [118] Francque S, Szabo G, Abdelmalek MF, Byrne CD, Cusi K, Dufour JF. Nonalcoholic steatohepatitis: the role of peroxisome proliferator-activated receptors. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2021 Jan;18(1):24–39. <https://doi.org/10.1038/s41575-020-00366-5>.
- [119] Staels B, Rubenstrunk A, Noel B, Rigou G, Delataille P, Millatt LJ, et al. Hepatoprotective effects of the dual peroxisome proliferator-activated receptor alpha/delta agonist, GFT505, in rodent models of nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2013;58:1941–1952. <https://doi.org/10.1002/hep.26461>.
- [120] Ratziu V, Harrison SA, Francque S, Bedossa P, Leheret P, Serfaty L, et al. Elafibranor, an agonist of the peroxisome proliferator-activated receptor- α and - δ , induces resolution of nonalcoholic steatohepatitis without fibrosis worsening. *Gastroenterology* 2016;150:1147–1159. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2016.01.038>.
- [121] Sven Franque MA. Saroglitazar for the treatment of NASH: the PPAR story goes on! *Hepatology* 2021 Jun 23. <https://doi.org/10.1002/hep.32024>.

- [122] Joshi SR. Saroglitazar for the treatment of dyslipidemia in diabetic patients. *Expert Opin Pharmacother* 2015;16:597–606. <https://doi.org/10.1517/14656566.2015.1009894>.
- [123] Wettstein G, Luccarini JM, Poekes L, Faye P, Kupkowski F, Adarbes V, et al. The newgeneration pan-peroxisome proliferator-activated receptor agonist IVA337 protects the liver from metabolic disorders and fibrosis. *Hepatol Commun* 2017;1:524–537. <https://doi.org/10.1002/hep4.1057>.
- [124] Gawrieh S, Noureddin M, Loo N, Mohseni R, Awasty V, Cusi K, et al. Saroglitazar, a PPAR- α/γ agonist, for treatment of nonalcoholic fatty liver disease: a randomized controlled double-blind phase 2 trial. *Hepatology* 2021 Apr 2. <https://doi.org/10.1002/hep.31843>.
- [125] Kim MJ, Lin WQ. DUR-928, an endogenous regulatory molecule, exhibits anti-inflammatory and antifibrotic activity in a mouse model of NASH. Poster session presented at. AASLD's Emerg Trends NAFLD 2017;17–18.
- [126] Gastaldelli A, Stefan N, Häring HU. Liver-targeting drugs and their effect on blood glucose and hepatic lipids. *Diabetologia* 2021 Apr 20. <https://doi.org/10.1007/s00125-021-05442-2>.
- [127] Sanyal A, Charles ED, Neuschwander-Tetri BA, Loomba R, Harrison SA, Abdelmalek MF, et al. Pegbelfermin (BMS-986036), a PEGylated fibroblast growth factor 21 analogue, in patients with non-alcoholic steatohepatitis: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2a trial. *Lancet* 2019 Dec 22;392(10165):2705–2717.
- [128] Arab JP, Karpen SJ, Dawson PA, Arrese M. Bile acids and nonalcoholic fatty liver disease: molecular insights and therapeutic perspectives. *Hepatology* 2017;65:350–362.
- [129] Harrison SA, Rossi SJ, Paredes AH, Trotter JF, Bashir MR, Guy CD, et al. NGM282 improves liver fibrosis and histology in 12 weeks in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2020;71:1198–1212.
- [130] Barreyro FJ, Holod S, Finocchietto PV, Camino AM, Aquino JB, Avagnina A, et al. The pan-caspase inhibitor Emricasan (IDN-6556) decreases liver injury and fibrosis in a murine model of non-alcoholic steatohepatitis. *Liver Int* 2015;35(3):953–966. <https://doi.org/10.1111/liv.12570>.
- [131] Harrison Stephen A, Goodman Zachary, Abdul Jabbar, Vemulapalli Ravi, Younes Ziad H, Bradley Freilich, et al. A randomized, placebo-controlled trial of emricasan in patients with NASH and F1-F3 fibrosis. *J Hepatol* 2020 May;72(5):816–827. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2019.11.024>.
- [132] Garcia-Tsao Guadalupe, Bosch Jaime, Kayali Zeid, Harrison Stephen A, Abdelmalek Manal F, Lawitz Eric, et al. Randomized placebo-controlled trial of emricasan for non-alcoholic steatohepatitis-related cirrhosis with severe portal hypertension. *J Hepatol* 2020 May;72(5):885–895. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2019.12.010>.
- [133] Brenner C, Galluzzi L, Kepp O, Kroemer G. Decoding cell death signals in liver inflammation. *J Hepatol* 2013;59:583–594. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2013.03.033>.
- [134] Moon HJ, Finney J, Ronnebaum T, Mure M. Human lysyl oxidase-like 2. *Bioorg Chem* 2014;57:231–241. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2014.07.003>.
- [135] Loomba R, Lawitz E, Mantry PS, Jayakumar S, Caldwell SH, Arnold H, et al. The ASK1 inhibitor selonsertib in patients with nonalcoholic steatohepatitis: a randomized, phase 2 trial. *Hepatology* 2018;67(2):549–559. <https://doi.org/10.1002/hep.29514>.
- [136] Harrison Stephen A, Wai-Sun Wong Vincent, Okanoue Takeshi, Bzowej Natalie, Raj Vuppalanchi, Younes Ziad, et al. Selonsertib for patients with bridging fibrosis or compensated cirrhosis due to NASH: results from randomized phase III STELLAR trials. *J Hepatol* 2020 Jul;73(1):26–39. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2020.02.027>.
- [137] Marra F, Tacke F. Roles for chemokines in liver disease. *Gastroenterology* 2014;147(3):577–594. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2014.06.043>.
- [138] Henderson NC, Sethi T. The regulation of inflammation by galectin-3. *Immunol Rev* 2009;230:160–171. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2009.00794.x>.
- [139] Chalasani N, Abdelmalek MF, Garcia-Tsao G, Vuppalanchi R, Alkhouri N, Rinella M, et al. Belaepectin (GR-MD-02) study investigators. Effects of belaepectin, an inhibitor of galectin-3, in patients with nonalcoholic steatohepatitis with cirrhosis and portal hypertension. *Gastroenterology* 2020;158(5):1334–1345. e5. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2019.11.296>.

Physiopathologie de la stéatose hépatique non-alcoolique (NAFLD)

Lucia Parlati^{1,2}, Marion Régnier¹, Catherine Postic¹, Hervé Guillou³

Disponible sur internet le :
25 mars 2023

1. Université Paris Cité, institut Cochin, CNRS, Inserm, Paris, France
2. Hôpital Cochin, service des maladies du foie, Paris, France
3. Université de Toulouse, Toxalim, INRA, ENVT, INP-Purpan, UPS, Toulouse, France

Correspondance :

Hervé Guillou, UMR 1331 TOXALIM INRAE, équipe de toxicologie intégrative & métabolisme, 180, chemin de Tournefeuille, BP 93173, 31027 Toulouse cedex 3, France.
herve.guillou@inrae.fr

Mots clés

NAFLD
Résistance à l'insuline
Lipolyse
Lipogénèse
Lipotoxicité
Hépatokine

Keywords

NAFLD
Insulin resistance
Lipolysis
Lipogenesis
Lipotoxicity
Hepatokine

■ Résumé

Les hépatopathies stéatosiques métaboliques, ou *Non alcoholic Fatty Liver Diseases* (NAFLD), sont un spectre large de maladies du foie, de la stéatose bénigne, à l'inflammation et à la fibrose. Leur prévalence augmente et en l'absence de traitement, elles représentent un enjeu de recherche et de santé publique. De nombreuses études pré cliniques et cliniques ont permis d'approfondir nos connaissances sur son étiologie et sa physiopathologie, en particulier sur les liens entre NAFLD, obésité et diabète de type 2. Dans cet article, nous faisons une revue des voies métaboliques impliquées dans l'homéostasie des lipides, leur lien avec la sensibilité à l'insuline et leur rôle dans la physiopathologie de la NAFLD.

■ Summary

Pathophysiology of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD)

Non-alcoholic fatty liver diseases (NAFLD) are chronic liver diseases that include simple and benign steatosis, to more severe inflammation and irreversible fibrotic stages. They are the leading chronic liver diseases worldwide and an unmet medical need as there is no treatment and they are major public health issue. Both clinical and pre-clinical studies have provided possible mechanisms underlying NAFLD pathogenesis and its link with obesity and type 2 diabetes. In this article, we review some of the pathways involved in hepatic lipid homeostasis, their sensitivity to insulin signalling and their role in the metabolic origins of NAFLD and its progression.

Introduction

Les hépatopathies stéatosiques métaboliques, ou *Non Alcoholic Fatty Liver Diseases* (NAFLD), sont des maladies chroniques du foie dont la prévalence est associée à l'obésité et au diabète de type 2 (DT2) [1]. Le stade précoce de la maladie est la stéatose et se caractérise par une accumulation de lipides dans les hépatocytes. Cette stéatose prédispose à des stades plus graves avec des dommages inflammatoires et/ou fibrosants qui peuvent conduire à une cirrhose ou à un cancer [2]. Dans cette revue, nous nous intéresserons au métabolisme des lipides qui s'accumulent dans la NAFLD et à leurs liens avec la sensibilité à l'insuline, ainsi qu'aux conséquences de leur accumulation au niveau hépatocytaire.

Source des lipides stockés dans la stéatose hépatique

En conditions physiologiques, l'insuline exerce un effet antilipolytique sur le tissu adipeux blanc, limitant ainsi la libération d'acides gras libres (AGL) dans la circulation sanguine. De manière intéressante, des études conduites chez l'Homme, utilisant des traceurs métaboliques, ont permis de montrer que la lipolyse adipocytaire représentait une source majeure de lipides s'accumulant dans le foie de patients atteints de NAFLD [3]. Ce dialogue entre organes, impliquant le tissu adipeux blanc et le foie, apparaît donc essentiel dans la pathogenèse de la NAFLD.

La résistance à l'insuline augmente la libération d'AGL par le tissu adipeux blanc, en raison de la diminution de l'action antilipolytique de l'insuline. En conséquence, les lipides périphériques stockés dans le tissu adipeux blanc sont la source d'un flux d'AGL vers le foie (figure 1). Après estérification, les AGL peuvent être stockés sous forme de gouttelettes lipidiques dans les hépatocytes ou sécrétés dans le sang sous forme de lipoprotéines de très faible densité (*very-low density lipoproteins* [VLDL]) ou oxydés dans la mitochondrie.

Les points essentiels

- La première source de lipides qui s'accumulent dans le foie de patient atteint d'hépatopathie stéatosique métabolique (*Nonalcoholic Fatty Liver Diseases*, NAFLD) est le tissu adipeux.
- La seconde source de lipides hépatocytaires dans la NAFLD provient de la lipogenèse *de novo*.
- Les lipides qui s'accumulent dans les étapes précoces de NAFLD exercent des effets cytotoxiques qui participent à l'initiation de lésions inflammatoires.
- La NAFLD a une influence métabolique et cardiovasculaire en modulant la production de certaines hormones hépatiques, appelées hépatokines.

La β -oxydation des acides gras (AG) se produit au sein de la matrice mitochondriale. Les AG à chaîne courte et moyenne peuvent entrer librement dans la matrice mitochondriale. En revanche, les AG à longue chaîne doivent être transportés dans les mitochondries par la navette carnitine, une étape limitant la vitesse d'entrée. La β -oxydation implique l'élimination séquentielle des segments de deux carbones sous forme d'acétyl-coenzyme A (acétyl-CoA) et la production d'acyl-CoA à chaîne courte, avec réduction simultanée d'un FAD (flavine adénine dinucléotide) et d'un NAD⁺ (nicotinamide adénine dinucléotide). Les électrons portés par NADH⁺ et FADH₂ entrent immédiatement dans le système de transfert d'électrons du système de phosphorylation oxydative, tandis que l'acétyl-CoA entre dans le cycle de l'acide tricarboxylique (cycle de Krebs).

L'isotype alpha du récepteur nucléaire, appelé *Peroxisome proliferator activated receptor* (PPAR α), joue un rôle important dans le contrôle hépatocytaire des gènes codant pour de nombreuses enzymes limitantes du catabolisme des AG [3]. L'activité de ce récepteur est induite par liaison de diverses formes de lipides. Il est très actif lors du jeûne ou lorsque l'insulinémie basse favorise la lipolyse du tissu adipeux et l'afflux d'AGL dans le foie. La lipolyse du tissu adipeux contrôle donc l'activité hépatocytaire de PPAR α , le contrôle du catabolisme des AG, la production de corps cétoniques et de l'hépatokine FGF21 (*Fibroblast Growth Factor 21*) [3,4]. L'absence de PPAR α dans les hépatocytes favorise la stéatose et la stéatohépatite non-alcoolique (ou *Non-Alcoholic SteatoHepatitis*, NASH) [3,5,6]. Par ailleurs, il a été démontré que les patients présentant une NAFLD ont une augmentation de leur consommation d'oxygène dans les tissus hépatiques et les mitochondries hépatiques isolées, mais ces paramètres diminuent lorsque la NASH se développe [7]. Une explication possible serait que les mitochondries hépatiques puissent compenser une surcharge nutritionnelle chronique avec une activité accrue aux premiers stades de la NAFLD (concept de « flexibilité » mitochondriale), alors qu'à des stades ultérieurs, les mitochondries seraient dans l'incapacité de compenser (« inflexibilité » mitochondriale). Une autre possibilité pourrait être liée à une baisse de l'expression et de l'activité de PPAR α rapportée chez les patients atteints de NASH [8].

L'insuffisance énergétique mitochondriale peut entraîner :

- une oxydation incomplète des AG et de la synthèse d'intermédiaires lipidiques toxiques, qui altèrent la signalisation de l'insuline ;
- la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) ;
- une inflammation et une nécrose hépatocytaire.

Rôle de la synthèse *de novo* d'acides gras hépatocytaires

L'insuline agit aussi directement sur le foie. Tout d'abord, en favorisant le métabolisme des glucides *via* la glycogénèse, permettant ainsi la mise en réserve de glucose sous forme

La résistance à l'insuline est souvent associée à la NAFLD et contribue à sa pathogénie. L'absence d'inhibition de la production hépatique de glucose est une des caractéristiques métaboliques du DT2 et elle est en partie secondaire à une hyperglucagonémie et à une insulino-résistance hépatique. La résistance à l'insuline, pourtant caractérisée par une réduction des effets hypoglycémisants de l'insuline, permet cependant le maintien d'une lipogenèse active, via l'activation du facteur de transcription *Sterol Regulatory Element Binding Protein 1c* (SREBP-1c) [12,13].

Différentes études ont proposé la notion de « sélectivité » de la résistance à l'insuline [14,15]. En situation physiologique, l'insuline inhibe la production hépatique de glucose et stimule la lipogenèse *de novo* ainsi que la sécrétion hépatique de lipoprotéines riches en triglycérides (TG) ou lipoprotéines de très faible densité (VLDL), qui seront stockées dans le tissu adipeux. En revanche, chez les patients obèses, l'insulino-résistance entraîne une augmentation de la production hépatique de glucose et l'apparition du DT2. De plus, la voie lipogénique, impliquant notamment SREBP-1c, reste fonctionnelle et sa stimulation constante en situation d'hyperinsulinémie favorise la stéatose hépatique et la dyslipidémie. Il y aurait donc une incapacité de l'insuline à inhiber la production hépatique de glucose, bien, qu'en parallèle, l'insuline reste toujours capable de favoriser la lipogenèse.

Mais cette notion d'insulino-résistance sélective est débattue, car des travaux récents indiquent que, chez des patients atteints de DT2 et de NAFLD, l'insuline ne stimule plus la lipogenèse hépatique [16]. En revanche, cette lipogenèse resterait bien active, probablement sous le contrôle du flux métabolique et de voies de signalisation sensibles à l'insuline.

La signalisation dépendante du glucagon a été moins étudiée, mais elle joue aussi un rôle dans les maladies métaboliques chroniques, dont la NAFLD [17]. La résistance au glucagon associée à la NAFLD influe sur le métabolisme des acides aminés et des lipides, la stéatose, l'hyperglucagonémie, et le stress oxydatif qui contribue à la progression des NAFLD [18].

De l'accumulation de lipides vers la NASH

Plusieurs classes de lipides sont associées à la NAFLD et participent à sa progression. Même si le cholestérol libre [19], les diacylglycérides [20], les sphingolipides [21] et certains phospholipides [22] exercent des effets lipotoxiques, la lipotoxicité a surtout été étudiée en réponse aux AGL, à la fois *in vitro* et sur des modèles *in vivo*.

Les principaux lipides qui s'accumulent dans les hépatocytes lors des NAFLD sont les TG, et l'inhibition d'enzymes limitantes de leur biosynthèse protège de la stéatose [23,24]. Au contraire, certaines études proposent que les TG ne soient pas directement responsables de la progression de la stéatose vers les stades plus graves, en particulier inflammatoires (NASH) [25]. Ces TG pourraient représenter une forme de stockage et de protection

vis-à-vis des AG cytotoxiques, dont les AG saturés à longues chaînes, tels que l'acide palmitique (C16:0) et l'acide stéarique (C18:0).

En effet, différentes études ont montré que l'inhibition de la synthèse de TG réduit la stéatose mais augmente les dommages hépatiques dans des modèles pré-cliniques d'obésité [25,26]. Ces travaux, combinés avec des études menées *in vitro* [27,28], suggèrent que les AGL pourraient jouer un rôle important dans la physiopathologie de la NAFLD en participant en contrôle de l'apoptose. Ainsi, l'acide palmitique et l'acide stéarique induisent l'apoptose dans les hépatocytes. Ces AG saturés sont plus toxiques que les AG insaturés. L'accumulation d'AG participe au stress du réticulum endoplasmique et à l'apoptose des hépatocytes, et ces séquences d'évènement semblent cohérentes avec les observations cliniques [29,30]. Néanmoins, la lipotoxicité hépatocytaire est probablement insuffisante pour déclencher seule l'ensemble des dommages tissulaires qui correspondent à tous les stades de NAFLD. La progression de la NAFLD vers les atteintes les plus sévères engage également d'autres types cellulaires hépatiques [31] et les cellules du système immunitaire [32,33], dont les macrophages [33,34]. En résumé, l'insulino-résistance associée à l'obésité favorise l'accumulation hépatique de lipides, dont les AGL, qui en s'accumulant dans les hépatocytes induisent le stress du réticulum endoplasmique, l'apoptose et des évènements initiateurs de l'inflammation du foie.

Hépatokines et effets systémiques des NAFLD

Se pose aussi la question des mécanismes par lesquels l'accumulation des lipides hépatocytaires se traduit par une augmentation des risques de maladies métaboliques et cardiovasculaires. Aussi, par analogie avec le tissu adipeux, l'hypothèse a été posée qu'un foie stéatosé exerce des effets endocrines différents de ceux d'un foie sain, relayés par des hormones d'origine hépatocytaire [35].

Ces hépatokines ont récemment pris une place importante dans les recherches sur les NAFLD. D'ailleurs, certaines d'entre elles exercent des effets bénéfiques sur l'homéostasie énergétique en physiologie, et d'autres représentent des options thérapeutiques intéressantes dans le traitement des maladies métaboliques, dont la NAFLD [36].

Chez l'homme, l'hépatokine la plus étudiée est la Fétuine A dont le rôle et les effets métaboliques associés à la NAFLD ont été mis en évidence dans plusieurs études. Son expression hépatique est augmentée en réponse aux AGL [37] et au glucose [38]. La Fétuine A inhibe la signalisation du récepteur à l'insuline dans le foie et dans le muscle [39]. Complexée aux AG, elle peut aussi induire une signalisation inflammatoire dans les macrophages et favoriser l'insulino-résistance adipocytaire [40]. Elle inhibe aussi la sécrétion d'insuline en réponse au glucose et la maturation de cellules β du pancréas [41,42].

Depuis, une vingtaine d'hépatokines sont étudiées pour leur rôle possible dans les effets systémiques des NAFLD [35]. C'est notamment le cas du *Fibroblast Growth Factor 21* (FGF21 : effets centraux et sur les tissus adipeux) [43], de l'*Angiopoietin-like protein 3* (ANGPTL3 : effets sur le pancréas endocrine) [44], de la *Sex Hormone-Binding Globulin* (SHBG : effets adipocytaires) [45], de la sélénoprotéine P (effets pancréatique et musculaire) [46], de la Fétuine B (effets musculaires) [47] et de la follistatine (effets adipocytaires et musculaires) [48,49].

Conclusion

La NAFLD est la principale maladie chronique du foie au niveau mondial. Il s'agit d'une maladie complexe qui implique des facteurs environnementaux (alimentation, régimes

hyperglucidiques et en particulier le fructose, habitudes alimentaires, microbiote) et génétiques. Son stade avancé, la NASH, favorise l'apparition de cirrhose, voire de cancers hépatiques. Dans cette revue, nous avons mentionné les liens entre l'apparition de la NAFLD et l'insulinorésistance qui favorise les étapes précoces de la pathologie ou stéatose, une accumulation excessive de lipides dans les hépatocytes. Nous avons également discuté du rôle de cette accumulation de lipides dans la progression de la maladie vers des stades inflammatoires, ainsi que de certains effets systémiques.

Déclaration de liens d'intérêts : les auteurs déclarent ne pas avoir de liens d'intérêts.

Références

- [1] Loomba R, Friedman SL, Shulman GI. Mechanisms and disease consequences of non-alcoholic fatty liver disease. *Cell* 2021;184:2537-64.
- [2] Donnelly KL, Smith CI, Schwarzenberg SJ, et al. Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *J Clin Invest* 2005;115:1343-51.
- [3] Montagner A, Polizzi A, Fouché E, et al. Liver PPAR α is crucial for whole body fatty acid homeostasis and is protective against NAFLD. *Gut* 2016;65:1202-14.
- [4] Fougerat A, Schoiswohl G, Polizzi A, et al. ATGL-dependent white adipose tissue lipolysis controls hepatocyte PPAR α activity. *Cell Rep* 2022;39:110910.
- [5] Régnier M, Polizzi A, Smati S, et al. Hepatocyte-specific deletion of Ppar α promotes NAFLD in the context of obesity. *Sci Rep* 2020;10:6489.
- [6] Pawlak M, Lefebvre P, Staels B. Molecular mechanism of PPAR α action and its impact on lipid metabolism, inflammation and fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol* 2015;62:720-33.
- [7] Koliaki C, Szendroedi J, Kaul K, et al. Adaptation of hepatic mitochondrial function in humans with non-alcoholic fatty liver is lost in steatohepatitis. *Cell Metab* 2015;21:739-46.
- [8] Francque S, Verrijken A, Caron S, et al. PPAR α gene expression correlates with severity and histological treatment response in patients with non-alcoholic steatohepatitis. *J Hepatol* 2015;63:164-73.
- [9] Benhamed F, Denechaud PD, Lemoine M, et al. The lipogenic transcription factor ChREBP dissociates hepatic steatosis from insulin resistance in mice and humans. *J Clin Invest* 2012;122:2176-94.
- [10] Abdul-Wahed A, Guilmeau S, Postic C. Sweet sixteenth for ChREBP: established roles and future goals. *Cell Metab* 2017;26:324-41.
- [11] Miyazaki M, Flowers MT, Sampath H, et al. Hepatic stearyl-CoA desaturase-1 deficiency protects mice from carbohydrate-induced adiposity and hepatic steatosis. *Cell Metab* 2007;6:484-96.
- [12] Horton JD, Goldstein JL, Brown MS. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J Clin Invest* 2002;109:1125-31.
- [13] Ferré P, Phan F, Foufelle F. SREBP-1c and lipogenesis in the liver: an update. *Biochem J* 2021;478:3723-39.
- [14] Brown MS, Goldstein JL. Selective versus total insulin resistance: a pathogenic paradox. *Cell Metab* 2008;7:95-6.
- [15] Li S, Brown MS, Goldstein JL. Bifurcation of insulin signaling pathway in rat liver: mTORC1 required for stimulation of lipogenesis, but not inhibition of gluconeogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010;107:3441-6.
- [16] Ter Horst KW, Vatner DF, Zhang D, et al. Hepatic insulin resistance is not pathway selective in humans with non-alcoholic fatty liver disease. *Diabetes Care* 2021;44:489-98.
- [17] Richter MM, Galsgaard KD, Elmelund E, et al. The liver- α -cell axis in health and in disease. *Diabetes* 2022;71:1852-61.
- [18] Galsgaard KD. The vicious circle of hepatic glucagon resistance in non-alcoholic fatty liver disease. *J Clin Med* 2020;9:4049.
- [19] Ioannou GN. The role of cholesterol in the pathogenesis of NASH. *Trends Endocrinol Metab* 2016;27:84-95.
- [20] Samuel VT, Shulman GI. Non-alcoholic fatty liver disease as a nexus of metabolic and hepatic diseases. *Cell Metab* 2018;27:22-41.
- [21] Régnier M, Polizzi A, Guillou H, Loiseau N. Sphingolipid metabolism in non-alcoholic fatty liver diseases. *Biochimie* 2019;159:9-22.
- [22] Paul B, Lewinska M, Andersen JB. Lipid alterations in chronic liver disease and liver cancer. *JHEP Rep* 2022;4:100479 [eCollection 2022 June].
- [23] Villanueva CJ, Monetti M, Shih M, et al. Specific role for acyl CoA:Diacylglycerol acyltransferase 1 (Dgat1) in hepatic steatosis due to exogenous fatty acids. *Hepatology* 2009;50:434-42.
- [24] Gluchowski NL, Gabriel KR, Chitruju C, et al. Hepatocyte deletion of triglyceride-synthesis enzyme acyl CoA: diacylglycerol acyltransferase 2 reduces steatosis without increasing inflammation or fibrosis in mice. *Hepatology* 2019;70:1972-85.
- [25] Hirsova P, Ibrabim SH, Gores GJ, Malhi H. Lipotoxic lethal and sublethal stress signaling in hepatocytes: relevance to NASH pathogenesis. *J Lipid Res* 2016;57:1758-70 [Erratum in: *J Lipid Res* 2017; 58:299].
- [26] Yamaguchi K, Yang L, McCall S, et al. Inhibiting triglyceride synthesis improves hepatic steatosis but exacerbates liver damage and fibrosis in obese mice with non-alcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2007;45:1366-74.
- [27] Listenberger LL, Han X, Lewis SE, et al. Triglyceride accumulation protects against fatty acid-induced lipotoxicity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:3077-82.
- [28] Malhi H, Barreyro FJ, Isomoto H, et al. Free fatty acids sensitise hepatocytes to TRAIL mediated cytotoxicity. *Gut* 2007;56:1124-31.
- [29] Malhi H, Kaufman RJ. Endoplasmic reticulum stress in liver disease. *J Hepatol* 2011;54:795-809.
- [30] Lebeaupin C, Vallée D, Hazari Y, et al. Endoplasmic reticulum stress signalling and the pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol* 2018;69:927-47.
- [31] Wiering L, Subramanian P, Hammerich L. Hepatic stellate cells: dictating outcome in non-alcoholic fatty liver disease. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* 2023. doi: 10.1016/j.jcmgh.2023.02.010. S2352-345X(23)00029-2 [Online ahead of print].
- [32] Haas JT, Vonghia L, Mogilenko DA, et al. Transcriptional network analysis implicates

- altered hepatic immune function in NASH development and resolution. *Nat Metab* 2019;1:604-14 [Erratum in: *Nat Metab* 2019; 1:744].
- [33] Lackey DE, Olefsky JM. Regulation of metabolism by the innate immune system. *Nat Rev Endocrinol* 2016;12:15-28.
- [34] Vonderlin J, Chavakis T, Sieweke M, Tacke F. The multifaceted roles of macrophages in NAFLD pathogenesis. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* 2023. doi: 10.1016/j.jcmgh.2023.03.002. S2352-345X(23)00039-5 [Online ahead of print].
- [35] Stefan N, Schick F, Birkenfeld AL, et al. The role of hepatokines in NAFLD. *Cell Metab* 2023;35:236-52.
- [36] Parlati L, Régnier M, Guillou H, Postic C. New targets for NAFLD. *JHEP Rep* 2021;3:100346 [eCollection 2021 Dec].
- [37] Wu C, Borné Y, Gao R, et al. Elevated circulating follistatin associates with an increased risk of type 2 diabetes. *Nat Commun* 2021;12:6486.
- [38] Takata H, Ikeda Y, Suehiro T, et al. High glucose induces transactivation of the α_2 -HS glycoprotein gene through the ERK1/2 signaling pathway. *J Atheroscler Thromb* 2009;16:448-56.
- [39] Auberger P, Falquerho L, Contreres JO, et al. Characterization of a natural inhibitor of the insulin receptor tyrosine kinase: cDNA cloning, purification, and anti-mitogenic activity. *Cell* 1989;58:631-40.
- [40] Pal D, Dasgupta S, Kundu R, et al. Fetuin-A acts as an endogenous ligand of TLR4 to promote lipid-induced insulin resistance. *Nat Med* 2012;18:1279-85.
- [41] Gerst F, Wagner R, Kaiser G, et al. Metabolic crosstalk between fatty pancreas and fatty liver: effects on local inflammation and insulin secretion. *Diabetologia* 2017;60:2240-51.
- [42] Gerst F, Kemter E, Lorza-Gil E, et al. The hepatokine fetuin-A disrupts functional maturation of pancreatic beta cells. *Diabetologia* 2021;64:1358-74.
- [43] Kliewer SA, Mangelsdorf DJ. A dozen years of discovery: insights into the physiology and pharmacology of FGF21. *Cell Metab* 2019;29:246-53.
- [44] Yilmaz Y, Ulukaya E, Atug O, Dolar E. Serum concentrations of human angiotensin-like protein 3 in patients with non-alcoholic fatty liver disease: association with insulin resistance. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2009;21:1247-51.
- [45] Saez-Lopez C, Barbosa-Desongles A, Hernandez C, et al. Sex hormone-binding globulin reduction in metabolic disorders may play a role in NAFLD development. *Endocrinology* 2017;158:545-59 [Erratum in: *Endocrinology* 2019; 160:1439].
- [46] Misu H, Takamura T, Takayama H, et al. A liver-derived secretory protein, selenoprotein P, causes insulin resistance. *Cell Metab* 2010;12:483-95.
- [47] Meex RC, Hoy AJ, Morris A, et al. Fetuin B is a secreted hepatocyte factor linking steatosis to impaired glucose metabolism. *Cell Metab* 2015;22:1078-89.
- [48] Tao R, Wang C, Stöhr O, et al. Inactivating hepatic follistatin alleviates hyperglycemia. *Nat Med* 2018;24:1058-69 [Erratum in: *Nat Med* 2018; 24:1628].
- [49] Tao R, Stöhr O, Wang C, et al. Hepatic follistatin increases basal metabolic rate and attenuates diet-induced obesity during hepatic insulin resistance. *Mol Metab* 2023;10:101703. doi: 10.1016/j.molmet.2023.101703.

Rôle de la O-GlcNAc transférase (OGT) dans la physiopathologie hépatique

La O-GlcNAcylation est une modification post-traductionnelle dynamique et réversible contrôlée par l'activité de deux enzymes, la O-GlcNAc transférase (OGT) et la O-GlcNAcase (OGA). Ces deux enzymes interviennent dans le cycle dynamique de la O-GlcNAcylation sur une grande variété de protéines cytosoliques, nucléaires et mitochondriales d'une manière sensible aux nutriments et au stress (Zhang et al., 2019). En conséquence, il a été proposé que la O-GlcNAcylation fonctionne comme un capteur de nutriments et de stress régulant les processus cellulaires allant de la transcription et de la traduction à la transduction du signal et au métabolisme. La perturbation de l'homéostasie de la O-GlcNAcylation est impliquée dans la physiopathologie de plusieurs maladies, notamment le cancer, le diabète ou la neurodégénérescence (Nie et Yi, 2019). Notre laboratoire a précédemment rapporté que la O-GlcNAcylation d'effecteurs clés du métabolisme contribue de manière significative à la gluco-lipotoxicité dans le foie (Guinez et al., 2011 ; Kuo et al., 2008) et dans les cellules β pancréatiques (Fardini et al., 2014 ; Filhoulaud et al., 2019).

Le premier objectif de ma thèse a été de déterminer plus précisément les conséquences d'une inactivation génique ciblée de l'enzyme OGT dans les hépatocytes *in vivo* et d'explorer l'effet d'un changement nutritionnel sur le phénotype hépatique. En utilisant des souris avec une inactivation constitutive et ciblée de l'OGT dans les hépatocytes (OGT^{LKO}), notre étude révèle que l'OGT est essentielle à l'homéostasie du foie. En effet, l'analyse de souris OGT^{LKO} âgées de 4 semaines a révélé un stress oxydant et un stress du RE importants, des dommages à l'ADN, ainsi qu'une inflammation et une fibrose hépatique. La sensibilité à l'apoptose induite par le stress oxydant et le stress du RE était également augmentée dans les hépatocytes OGT^{LKO}. Alors que l'expression de l'OGT a été partiellement restaurée dans le foie de souris OGT^{LKO} âgées de 8 semaines, les lésions hépatiques et la fibrose se sont aggravées avec le temps. Fait intéressant, le sevrage des souris OGT^{LKO} avec un régime cétogène a totalement prévenu les altérations hépatiques des souris OGT^{LKO}, indiquant qu'un apport réduit en glucides protège le foie déficient en OGT.

Le second objectif de mon travail de thèse a été de caractériser un modèle murin original présentant une délétion inductible de l'OGT hépatocytaire (OGT^{INDLKO}), afin de s'affranchir des facteurs confondants associés au développement post-natal. En effet, La caractérisation de ce modèle nous a permis de démontrer que le rôle de l'OGT dans le maintien de l'homéostasie hépatique est indépendant de l'âge des souris. En fait, les souris OGT^{INDLKO} âgées de 4 et 8 semaines ont le même phénotype hépatique que les souris OGT^{LKO} du même âge, avec un stress oxydant et un stress du RE important, une inflammation et une fibrose hépatique sous régime standard.

Enfin, afin de transposer nos études chez l'homme (troisième objectif de ma thèse), nous avons analysé les niveaux d'expression de l'OGT et de la O-GlcNAcylation hépatiques dans le foie d'une population de patients ayant subi une chirurgie bariatrique pour une obésité morbide (Cohorte Abos-CHU de Lille). Nous avons complété ces informations par une analyse informatique des données obtenues du foie de patients (hommes et femmes) ayant une MASLD histologiquement prouvée (Cohorte CHU de Toulouse). L'analyse de l'expression de l'OGT dans la cohorte Abos a révélé que l'expression de l'OGT et les niveaux de la O-GlcNAcylation hépatiques sont augmentés chez les patients atteints de stéatose et de MASH. De plus, nous avons identifié un dimorphisme sexuel du réseau de gènes dont l'expression hépatique est corrélée à celle de l'*Ogt*.

Ces résultats identifient l'OGT comme un médiateur clé de l'homéostasie et de la survie des hépatocytes et valident les souris OGT^{LKO} et OGT^{INDLKO} comme des modèles précieux pour évaluer les traitements contre la fibrose hépatique. Le rôle de l'OGT dans la physiopathologie de la MASLD devrait être exploré d'avantage afin d'identifier des cibles thérapeutiques potentielles.