



THÈSE

En vue de l'obtention du DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par l'Université Toulouse 3 - Paul Sabatier

Présentée et soutenue par

Jean PERSONNAZ

Le 18 octobre 2018

Rôle de la protéine HMGB1 dans la stéatose hépatique associée à l'obésité

Ecole doctorale : **BSB - Biologie, Santé, Biotechnologies**

Spécialité : **PHARMACOLOGIE**

Unité de recherche :

I2MC - Institut des Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires

Thèse dirigée par

VALET PHILIPPE

Jury

M. Jean-Sebastien Annicotte, Rapporteur
M. Nicolas Venteclef, Rapporteur
Mme Chantal Desdouets, Rapporteur
M. Christophe bureau, Examineur
M. VALET PHILIPPE, Directeur de thèse
M. jean-phillipe Pradere, Co-directeur de thèse



THÈSE

En vue de l'obtention du
DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par l'Université Toulouse 3 - Paul Sabatier

Présentée et soutenue par

Jean PERSONNAZ

Le 18 octobre 2018

**Rôle de la protéine HMGB1 dans la stéatose hépatique
associée à l'obésité**

Ecole doctorale : **BSB - Biologie, Santé, Biotechnologies**

Spécialité : **PHARMACOLOGIE**

Unité de recherche :

I2MC - Institut des Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires

Thèse dirigée par

VALET PHILIPPE

Jury

M. Jean-Sebastien Annicotte, Rapporteur
M. Nicolas Venteclef, Rapporteur
Mme Chantal Desdouets, Rapporteur
M. Christophe bureau, Examineur
M. VALET PHILIPPE, Directeur de thèse
M. jean-phillipe Pradere, Co-directeur de thèse

Remerciements ¹:

En premier lieu je tiens à remercier Christophe Bureau qui a accepté de présider le jury. Merci aussi à Chantal Desdouets, Nicolas Venteclef, Jean-Sébastien Anicotte et Catherine Postic pour l'évaluation de ce manuscrit ainsi que leur nombreuses remarques qui nous permettrons d'améliorer ce travail.

Ce travail est le fruit d'une rencontre 4 ans plus tôt avec toi JP, depuis le M2 jusqu'à la soutenance... Entre les deux, quelques déconvenues, beaucoup de surprises, de bons moments et quelques nigt sessions (Promis, c'est la dernière...). Grace à ta patience et ta bienveillance j'ai énormément gagné en rigueur tant scientifique que personnelle. Et je te remercie d'avoir toujours cru en moi et de m'avoir donné un bon coup de pied au c*I lorsque c'était nécessaire. Je crois qu'il faudrait trop de pages pour lister tout ce que j'ai appris avec toi mais en tout cas, MERCI pour tout !

Finalement, j'arrive au bout de cette aventure avec un brin de nostalgie mais en tout cas, tu seras toujours le bienvenu à Boston (si tu y viens ;)) et d'ici là, GO SOX !!

Philippe, Je vous remercie pour votre disponibilité et vos « petites » questions toujours bien senties. Je garderai un excellent souvenir de mon passage à l'AdipoLab, en partie grâce à vous.

En parlant d'AdipoLab (qui fut un peu ma seconde famille pendant ces 4 ans), je te remercie Cédric pour les discussions que nous avons pu avoir, ton regard critique mais toujours bienveillant. Merci pour m'avoir permis de rencontrer JP, finalement si j'en suis là c'est un peu grâce à toi !

Armelle merci pour les discussions de couloir, les petits coups de boost et le trèfle à 4 feuilles qui trône sur mon bureau depuis le concours de l'école Doc, comme quoi, ça marche !!!

Enzo, le dernier arrivé, je te souhaite de prendre autant de plaisir que j'en ai eu à travailler avec JP (#HMGBBoys)

Merci aussi aux autres membres de l'Adipolab : Isabelle, Berni, les Sophies, Alizée (Aller le Stade !!), Vanessa, Ophélie, Nancy, Johanna.

Je n'oublie pas non plus les anciens : Aurélie, Simon et Simon, Audren, Alysson, Cottura, Zaza (tu vois, même sans toi j'y suis arrivé), Adèle (Majorette) et Charles Merci pour tout, au labo et ailleurs (#TeteDansLeCoude).

¹Si je vous ai oublié, ne m'en tenez par rigueur et complétez les champs suivants : Merci à.....
..... pour

Merci aux co-bureau, Romain (#SeeYouInBoston) et Gwen (#MazElTov). Frannnnncheuuument c'était un régal d'être au quotidien avec vous, je vous souhaite plein de bonnes choses pour la suite !!

Je tiens aussi à remercier tous ceux qui ont pu m'apporter leur aide et expertise tout au long de ce projet notamment Hervé Guillou avec qui j'ai eu plaisir à échanger lors des comités de thèse (et en dehors...), nos voisins de l'équipe 4 (là où tout a commencé pour moi) Tata Aline, Etienne, Cédric, Dominique, mais aussi les plateformes de l'institut et de l'INRA.

Mes remerciements aussi à l'équipe enseignante de physio, en particulier à Virginie, Jenny, Pascale et Anne-Laure. Merci pour ces bons moments de joie pure devant une contraction d'anneau d'aorte. J'ai eu énormément de plaisir à travailler avec vous !

Ludo, Ali, Pierre, Isa, Nino vous ne le savez peut-être pas mais vous avez été d'une grande aide, sans vous tout aurait différent. Merci 1000x <3

Merci aussi à la Famille en particulier aux frangins et LA sister, merci pour tout ! Vous savez donc maintenant pourquoi je vous soule avec HMGB1 depuis tout ce temps. Je vous tire mon chapeau pour être restés jusqu'au bout et je vous attends de pied ferme à Boston ! Je ne vous oublie pas non plus mes chers parents, sans vous rien n'aurait été possible.

Enfin, last but not list, merci Chloé pour ta patience (si, si), ton support moral et ton écoute, la relecture attentive de ce manuscrit, ton sens de l'organisation, bref, merci pour tout.

« Dans la vie, rien n'est à craindre, tout est à comprendre » (Marie Curie)

« Savoir s'étonner à propos est le premier pas fait sur la route de la découverte » (Louis Pasteur)

Résumé

Au cours de l'obésité, l'excès de lipides circulants, est stocké dans les organes périphériques, principalement dans le foie. Ce stockage ectopique de lipide peut avoir, à long terme, des conséquences délétères sur le métabolisme glucidique. Au long cours, l'excès de lipides hépatiques peut conduire au développement de stéatopathies métaboliques pouvant évoluer vers la cirrhose et le cancer du foie. Dans l'hépatocyte, le métabolisme et l'homéostasie lipidique sont finement régulés par la balance entre la synthèse (LDN) et l'utilisation (β -oxydation) des lipides. Ces deux voies métaboliques sont sous le contrôle de plusieurs facteurs de transcriptions comme ChREBP, SREBP1 PPAR γ ou PPAR α . La compaction et l'accessibilité de la chromatine sont des éléments cruciaux pour la régulation indirecte de l'activité de ces facteurs de transcription. Dans le noyau, la compaction de l'ADN est régulée par les histones mais aussi par les protéines High Mobility Group (HMG). Parmi la famille des protéines HMG, la protéine High Mobility Group box 1 (HMGB1), principalement localisée dans le noyau, est capable de réguler de façon indirecte la transcription de gènes dans de nombreux tissus. En plus de son rôle nucléaire, HMGB1 peut être activement sécrétée par les cellules innées au cours de phénomènes inflammatoires aigus. Chez la souris, la délétion totale de cette protéine entraîne une hypoglycémie périnatale létale. De plus, chez la souris, les concentrations circulantes d'HMGB1 sont augmentées lors d'un stress métabolique induit par un régime hyper-lipidique (HFD). Tous ces résultats suggèrent un rôle d'HMGB1 dans le métabolisme hépatique et énergétique ainsi que dans les processus inflammatoires de bas-bruits associés au stress métabolique. Dans ce contexte, ce travail de thèse comporte trois objectifs : I/ : L'étude du rôle d'HMGB1 dans les hépatocytes au cours de la progression de la stéatose, II/ : L'étude du rôle biologique de la forme circulante d'HMGB1 au cours du stress métabolique et III/ : L'étude de la source tissulaire à l'origine de la forme circulante d'HMGB1. Ces travaux ont permis de démontrer qu'en tant que facteur nucléaire, HMGB1 réprimait la LDN hépatocytaire *via* un mécanisme PPAR γ -dépendant. Nous avons aussi pu mettre en évidence que l'inhibition de la sécrétion active d'HMGB1 pouvait être une potentielle cible thérapeutique pour limiter, chez la souris, la progression de la stéatose du foie au cours d'un régime HFD. Enfin, nos travaux ont permis de découvrir que le tissu adipeux pouvait constituer une source significative de la forme circulante d'HMGB1. Tous ces résultats pris ensemble ont permis de mieux caractériser et comprendre les fonctions biologiques de la protéine HMGB1 au cours du stress métabolique.

Abstract

During obesity, the excess of circulating lipids, are stored in the peripheral organs, and mainly in the liver. This ectopic storage of lipids may have long-term deleterious consequences on carbohydrate metabolism. Over time, excess of intra-hepatic lipids can lead to the development of steatohepatitis that can evolve to cirrhosis and liver cancer. In the hepatocyte, lipid homeostasis is finely regulated by the balance between synthesis (*de novo* lipogenesis-DNL) and degradation (β -oxidation) of lipids. These two metabolic pathways are under the control of several transcription factors like ChREBP, SREBP1, PPAR γ or PPAR α . The compaction and accessibility of chromatin are crucial parameters, which regulate the activity of these transcription factors. In the nucleus, the compaction of DNA is regulated by histones but also by High Mobility Group (HMG) proteins. Among the HMG protein family, High Mobility Group box 1 protein (HMGB1), mainly located in the nucleus, is able to indirectly regulate gene transcription in many tissues. In addition to its nuclear role, HMGB1 can be actively secreted by innate immune cells during acute inflammatory reactions. In mice, the global deletion of *Hmgb1* gene leads to perinatal lethality due to a severe hypoglycemia. Moreover, preliminary data from our laboratory show that circulating concentrations of HMGB1 are increased in mice subjected to high fat diet (HFD). All these results support a role of HMGB1 in hepatic and energetic metabolism but also in tissue-low grade inflammation related to metabolic stress. Thus, this thesis work has three objectives: I/: Study of the role of HMGB1 in hepatocytes during the progression of steatosis, II/: Study of the biological role of the circulating form of HMGB1 during the metabolic stress and III/: Study of the tissue source of the circulating form of HMGB1. This work has shown that HMGB1 represses hepatocyte DNL in a cell-autonomous manner *via* a PPAR γ -dependent mechanism. We also showed that the inhibition of active secretion of HMGB1 could be a potential therapeutic strategy to limit the progression of liver steatosis on mice subjected to HFD. Finally, our work showed that adipose tissue is an important source of the circulating form of HMGB1. All these results taken together have made it possible to better characterize and understand the biological functions of HMGB1 protein during metabolic stress.

Table des matières

I.	Introduction.....	1
A.	Généralités	1
1.	Anatomie	2
2.	Histologie.....	4
a)	Les Hépatocytes.....	4
b)	Les cellules endothéliales	6
c)	Les cellules de Küppfer	6
d)	Les cellules Stellaires	7
e)	Les cellules ovales.....	8
f)	Les cholangiocytes.....	9
3.	Les hépatokines.....	9
B.	Le foie, un organe clef du métabolisme énergétique	14
1.	Métabolisme glucidique hépatique.....	14
a)	Entrée du glucose dans l'hépatocyte	14
b)	Production d'énergie à partir du glucose : la glycolyse.....	16
c)	Stockage d'énergie à partir du glucose : la glycogénogenèse.....	17
d)	La néoglucogenèse	19
2.	Métabolisme lipidique hépatique	21
a)	Entrée des lipides dans l'hépatocyte.....	21
b)	Production d'énergie à partir des lipides	22
c)	La Lipogenèse De Novo hépatocytaire et synthèse de triglycérides.....	27
d)	Devenir des lipides synthétisés :	43
e)	Export dans les VLDL	46
C.	Stéatose, un premier pas vers le cancer	48
1.	Contexte physiopathologique	48

2.	Epidémiologie et Cascade pathologique	49
3.	Etiologie.....	52
a)	Sources d'acides gras	52
b)	Mécanismes mis en jeux	53
D.	NASH.....	56
1.	Prévalence	56
2.	Caractéristiques.....	56
3.	Traitements	57
E.	Cirrhose hépatique.....	61
1.	Caractéristiques.....	61
2.	Prévalence et traitement	61
3.	Génétique et épigénétique du NAFLD.....	62
4.	Modèles d'études.....	65
F.	HMG protéines	68
1.	HMGA	68
2.	HMGN.....	70
3.	HMGB	71
a)	HMGB2, 3 et 4	71
b)	HMGB1	72
II.	Objectifs de la thèse.....	93
III.	Résultats.....	97
A.	Objectif I : HMGB1 est un régulateur de la lipogenèse <i>de novo</i> hépatique.....	97
1.	Matériel et méthodes.....	97
2.	Résultats	102
B.	Objectif II : Etude du rôle biologique de la forme circulante d'HMGB1 au cours du stress métabolique	122
1.	Matériel et méthodes.....	122
2.	Résultats	124

C.	Objectif III : Tissus sources d'HMGB1 circulants au cours du stress métabolique.....	131
IV.	Discussion.....	183
A.	Utilité d'HMGB1 dans les cellules différenciées.....	183
B.	Rôle(s) d'HMGB1 dans le tissu adipeux.....	184
C.	Inhibitions pharmacologiques, des résultats contradictoires ou logiques ?.....	185
D.	HMGB1 une alarmine métabolique, sensing de l'état énergétique.....	186
V.	Annexes	191
A.	Autres réalisations.....	191
B.	Annexe 1 : Liste des gènes significativement régulés par la délétion d'HMGB1 au cours de stress métaboliques	192
VI.	Bibliographie.....	195

Table des illustrations et tableaux

FIGURE 1 : ZONATION D'UN LOBULE HEPATIQUE.	3
FIGURE 2 : STRUCTURE ET ORGANISATION DU FOIE.	4
FIGURE 3 : INTERACTION DES VOIES BIOCHIMIQUES HEPATOCYTAIRES.	15
FIGURE 4 : LA GLYCOLYSE HEPATIQUE.	17
FIGURE 5 : LA GLYCOGENOGENESE HEPATIQUE.	18
FIGURE 6 : LA GLYCOGENOLYSE HEPATIQUE.	19
FIGURE 7 : LA NEOGLUCOGENESE HEPATIQUE.	20
FIGURE 8 : OXYDATION DES LIPIDES DANS L'HEPATOCYTE.	24
FIGURE 9 : LA CETOGENESE HEPATOCYTAIRE.	26
FIGURE 10 : LA LIPOGENESE DE NOVO ET LA SYNTHESE DE TRIGLYCERIDES HEPATOCYTAIRE.	28
FIGURE 11 : STRUCTURE DES GENES DE L'ACC1 ET DE L'ACC2.	31
FIGURE 12 : ORGANISATION GENERALE DU FACTEUR ChREBP.	36
FIGURE 13 : MATURATION DE SREBP1-c.	37
FIGURE 14 : ORGANISATION GENERALE DES LXRS.	39
FIGURE 15 : STRUCTURE CANONIQUE DES RECEPTEURS PPARs.	41
FIGURE 16 : REGULATION DES RYTHMES CIRCADIENS.	43
FIGURE 17 : FORMATION DES GOUTTELETTES LIPIDIQUES DANS L'HEPATOCYTE.	45
FIGURE 18 : CONSTITUTION ET SECRETION DES VLDL PAR L'HEPATOCYTE.	46
FIGURE 19 : LA STEATOSE, UNE PORTE D'ENTREE VERS LE CANCER DU FOIE.	50
FIGURE 20 : CONTRIBUTION RELATIVE DES DIFFERENTES SOURCES D'ACIDES GRAS AU COURS DU DEVELOPPEMENT DE LA STEATOSE.	53
FIGURE 21 : STRUCTURE GENERALE DES PROTEINES HMG.	68
FIGURE 22 : COMPARAISON DES SEQUENCES PEPTIDIQUES DES PROTEINES HMGB1 CHEZ S.CEREVISIAE, C.ELEGANS, X.LAEVIS, M.MUSCULUS, H.SAPIENS ET D.RERIO.	73
FIGURE 23 : LES DIFFERENTS TYPES D'ADN RETROUVES DANS LES CELLULES MAMMIFERES.	74
FIGURE 24 : DETECTION DE L'ADN EXOGENE PAR LA VOIE CGAS.	78
FIGURE 25 : BILAN DES MODIFICATIONS POST-TRADUCTIONNELLES D'HMGB1.	79
FIGURE 26 : RECEPTEURS ET MODE D'ACTION D'HMGB1 AU COURS DE LA REPONSE IMMUNITAIRE.	86
FIGURE 27 : CONTROLE DE L'ACTIVITE D'HMGB1 SELON LE DEGRE D'OXYDO-REDUCTION.	88
FIGURE 28 : BILAN DES STRATEGIES PHARMACOLOGIQUES CIBLANT HMGB1.	92
FIGURE 29 : EVOLUTION DE L'EXPRESSION GENIQUE ET PROTEIQUE D'HMGB1 AU COURS DE LA STEATOSE.	94
FIGURE 30 : EVOLUTION DES CONCENTRATIONS PLASMATIQUES D'HMGB1 LORS D'UN STRESS METABOLIQUE.	94
FIGURE 31 : UN TRAITEMENT COURT AVEC INHIBITEUR DE LA SECRETION D'HMGB1 LIMITE LES CONSEQUENCES D'UN STRESS METABOLIQUE.	95
FIGURE 32 : A L'ETAT BASAL LA DELETION D'HMGB1 DANS LES HEPATOCYTES N'A AUCUN EFFET MAIS POURRAIT FAVORISER LA PROGRESSION DE LA FIBROSE ET/OU DE LA STEATOSE.	103

FIGURE 33 : LA DELETION D'HMGB1 HEPATOCYTAIRE NE FAVORISE PAS LA PROGRESSION DE LA FIBROSE HEPATIQUE INDUITE PAR UN REGIME CD.	105
FIGURE 34 : LA DELETION D'HMGB1 DANS LES HEPATOCYTES FAVORISE LA PROGRESSION DE LA STEATOSE INDUITE PAR UN REGIME HFD60% DE 12 SEMAINES.	107
FIGURE 35 : LA DELETION D'HMGB1 FAVORISE LA PROGRESSION DE LA STEATOSE INDEPENDAMMENT DE L'APPROCHE NUTRITIONNELLE CHOISIE.	108
FIGURE 36 : LA DELETION D'HMGB1 DANS L'HEPATOCYTE FAVORISE L'APPARITION D'UNE RESISTANCE A L'INSULINE HEPATIQUE.	110
FIGURE 37 : LA DELETION D'HMGB1 DANS LES HEPATOCYTES ENTRAINE UNE AUGMENTATION DE L'ACTIVITE DE LA LDN.	112
FIGURE 38 : L'EFFET « PRO-STEATOSE » DE LA DELETION D'HMGB1 EST MEDIE PAR UN PROGRAMME DE TRANSCRIPTION PPARγ-DEPENDANT.	114
FIGURE 39 : LA DELETION DE PPARγ REVERSE LE PHENOTYPE DES SOURIS HMGB1^{ΔHEP}.	116
FIGURE 40 : RORA ET RORγ POURRAIENT EN PARTIE EXPLIQUER LES EFFETS GENIQUES OBSERVES LORS DE LA DELETION HEPATIQUE D'HMGB1.	118
FIGURE 41 : HMGB1 PRESENTE UN PROFIL ATYPIQUE DE LIAISON A L'ADN.	120
FIGURE 42 : LE TRAITEMENT AUX ICM RALENTIT LA PROGRESSION DE LA STEATOSE INDUITE PAR UN REGIME HFD60%.	125
FIGURE 43 : LE TRAITEMENT AUX ICM N'A PAS D'EFFET SUR LA PROGRESSION DE LA STEATOSE ET LA FIBROSE INDUITE PAR UN REGIME MCDD.	127
FIGURE 44 : LE TRAITEMENT A LA GLY FAVORISE LA PROGRESSION DE LA STEATOSE INDUITE PAR UN REGIME HFD60%.	128
FIGURE 45 : LE TRAITEMENT A LA GLY EST SANS EFFET SUR LA PROGRESSION DE LA FIBROSE INDUITE PAR UN REGIME CD-HFD60%.	129
FIGURE 46 : EFFET DU TRAITEMENT AUX ICM SUR LES CONCENTRATIONS PLASMATIQUES D'HMGB1.	130
FIGURE 47 : AU COURS DU STRESS METABOLIQUE INDUIT PAR LE HFD, LES HEPATOCYTES NE SONT PAS LA SOURCE D'HMGB1 CIRCULANT.	131
FIGURE 48 : LA DELETION D'HMGB1 DANS LE TISSU ADIPEUX AMELIORE L'HOMEOSTASIE GLUCIDIQUE ET LA STEATOSE HEPATIQUE.	132
FIGURE 49 : LA DELETION D'HMGB1 DANS LES MACROPHAGES FAVORISE LA PROGRESSION DE LA FIBROSE.	134
FIGURE 50 : LA DELETION D'HMGB1 DANS LES MACROPHAGES AMELIORE L'HOMEOSTASIE GLUCIDIQUE AU COURS DE LA NASH.	135
FIGURE 51 : EVOLUTION DES CONCENTRATIONS CIRCULANTES D'HMGB1 LORS DE LA MISE A JEUN.	186
FIGURE 52 : EFFET DU TRAITEMENT A LA ROSI SUR LES CONCENTRATIONS PLASMATIQUES D'HMGB1.	187
FIGURE 53 : LA DELETION D'HMGB1 DANS L'HEPATOCYTE DIMINUE LA SECRETION DE FGF21.	188

TABLEAU 1 : TABLEAU RECAPITULATIF DES EFFETS ET TISSUS CIBLES DES PRINCIPALES HEPATOKINES.	13
TABLEAU 2 : CRITERES DE DIAGNOSTIC DU SME SELON L'OMS ET LE NATIONAL CHOLESTEROL EDUCATION PROGRAM ADULT TREATMENT PANEL III (NCEP ATPIII).	49
TABLEAU 3 : NOMBRE D'ETUDES ET PREVALENCE DE LA NALFD.	51
TABLEAU 4 : CLASSES DE LIPIDES AU COURS DE LA PROGRESSION DE LA STEATOSE.	54
TABLEAU 5 : LE NAFLD ACTIVITY SCORE.	57
TABLEAU 6 : LISTE DES MOLECULES EN DEVELOPPEMENT CLINIQUE POUR LE TRAITEMENT DE LA NASH.	59
TABLEAU 7 : PRINCIPAUX MODELES PHYSIOPATHOLOGIQUES UTILISES DANS LES ETUDES SUR LE NAFLD.	66
TABLEAU 8 : PHENOTYPE DES DIFFERENTS MODELES MURINS DE DEFICIENCE EN HMGN1, HMGN2, HMGN3 ET HMGN5.	70
TABLEAU 9 : EFFET D'HMGB1 SUR LES DIFFERENTS FACTEURS DE TRANSCRIPTION.	76
TABLEAU 10 : GENES SIGNIFICATIVEMENT UP-REGULES, AU COURS DE DIFFERENTS STRESS METABOLIQUES, PAR LA DELETION D'HMGB1 DANS L'HEPATOCYTE.	192
TABLEAU 11 : GENES SIGNIFICATIVEMENT DOWN-REGULES, AU COURS DE DIFFERENTS STRESS METABOLIQUES, PAR LA DELETION D'HMGB1 DANS L'HEPATOCYTE.	193

I. Introduction

A. Généralités

Pour les Mésopotamiens, le foie est le centre de l'âme et des émotions. Les Egyptiens momifiaient le foie avant de le mettre dans un vase canope. Le mythe de Prométhée nous apprend que les Grecs avaient mis en évidence une des caractéristiques du foie : sa capacité à régénérer. En effet, le titan Prométhée, pour avoir donné le feu aux Hommes, fut condamné par les Dieux à avoir chaque jour le foie dévoré par un aigle.

Hippocrate dans la *Théorie des Humeurs* attribue aux organes « spongieux », dont le foie fait partie, un rôle prédominant dans la production des humeurs. Dans cette théorie, le foie est le centre de production de la bile jaune et du sang.

Claude Galien (129-216) étudie le développement de l'embryon et du fœtus et postule que le foie fait partie des premiers organes à se développer avec le cœur et le cerveau. Le triptyque cœur-cerveau-foie est au centre de la médecine Galénique qui, s'appuyant sur les écrits d'Hippocrate, considère alors trois centres psychiques : le cerveau, le cœur et le foie. Pour Galien, le foie est la source du sang, la faculté nutritive, c'est aussi le centre du désir.

Le moyen-âge considère le foie comme le producteur du sang veineux. Et il faut attendre 1848 et les travaux de Claude Bernard pour comprendre que le foie est un « organe producteur de matière sucrée chez l'animal et chez l'homme » (Bernard, 1853). Outre son rôle dans la régulation de la glycémie, le foie participe entre autres, à l'absorption et la digestion des lipides, au métabolisme du fer et à la réponse immunitaire.

Même de nos jours, le foie reste un organe étroitement lié à notre état émotionnel : se « ronger les foies » est synonyme de se faire du souci alors que la peur nous « donne les foies ». Dans la culture populaire le foie est considéré comme le senseur des excès en tout genre, responsables de la « crise de foie ». Plus qu'une usine à nettoyer l'organisme le foie est l'Organe central du métabolisme et de l'homéostasie.

1. Anatomie

Le foie a pour origine embryonnaire l'endoderme de la future région duodénale. L'apparition de cet organe est précoce : dès le 24^{ième} jour le développement du bourgeon hépatique est induit par le mésoderme cardiaque, au cours de l'embryogenèse le foie est le siège de l'hématopoïèse.

Le bourgeon hépatique se scinde en deux parties :

- *Le bourgeon hépatique* proprement dit, qui donnera les hépatocytes et les cellules épithéliales des conduits biliaires intra hépatiques
- *Le bourgeon biliaire* donnant la vésicule biliaire et les voies biliaires extra-hépatiques.

Le foie est un organe de couleur marron, d'aspect lisse et homogène dont la surface est recouverte d'une capsule fibreuse : la capsule de Glisson. Situé dans la partie supérieure droite de l'abdomen sous le diaphragme, il est en partie protégé par les côtes. Chez l'Homme on décrit extérieurement deux lobes principaux séparés par le ligament falciforme : le lobe droit (représentant 75% du volume) et le lobe gauche (25% du volume). Le foie représente environ 2% du poids corporel, soit un poids moyen de 1,5kg, ce qui en fait l'organe le plus volumineux de l'organisme humain. Chez un individu sain, le volume de cet organe connaît des variations circadiennes importantes : son volume varie de près de 20% au cours de la journée (Leung et al., 1986). Ces variations de volume peuvent s'expliquer par le contenu en glycogène, le flux sanguin ou le contenu en fluides.

Chez la souris, le foie est composé de cinq lobes inégaux : les lobes latéraux gauches et droit, les lobes intermédiaires gauches et droit, le lobe carré et le lobe caudé. Parmi ces cinq lobes, le lobe latéral gauche est le plus volumineux. Dans ce modèle murin, le poids du foie représente environ 4% du poids corporel. Comme chez l'Homme, le volume hépatique connaît de grandes variations diurnes : ici le volume varie de 34% au cours de la journée. Ces variations s'expliquent notamment par une accumulation de protéines (Sinturel et al., 2017).

Chez les mammifères, le parenchyme hépatique s'organise en lobules hexagonaux, constituant l'unité fonctionnelle, centrés sur une veine centro-lobulaire avec à chaque sommet, un espace porte ou triade portale composée d'une artère hépatique, d'une veine porte, et d'un canalicule biliaire.

Le foie possède deux systèmes circulatoires : un système sanguin et un système biliaire. La vascularisation propre du foie est assurée par les artères et veines hépatiques et draine aussi le sang provenant de la totalité du tube digestif *via* la veine porte. Le foie est un des organes les plus vascularisés de l'organisme, le débit sanguin hépatique est de 1,4L/min (soit 2000L/jour), et contient

environ 10% du volume sanguin total ce qui représente 20 à 25% du volume du foie. Cependant, le mélange du sang artériel et veineux qui s'opère dans le foie entraîne une faible pression en O₂ dans ce tissu.

Au sein d'un lobule la pression en O₂ varie de la périphérie (forte pression en O₂) vers le centre (faible pression en O₂). Ce gradient d'oxygène permet de décrire trois zones (Lee-Montiel et al., 2017) (**Fig 1**) :

- Zone 1 ou zone périportale, fortement oxygénée
- Zone 2 ou zone de transition
- Zone 3 ou zone périveineuse, plus faiblement oxygénée.

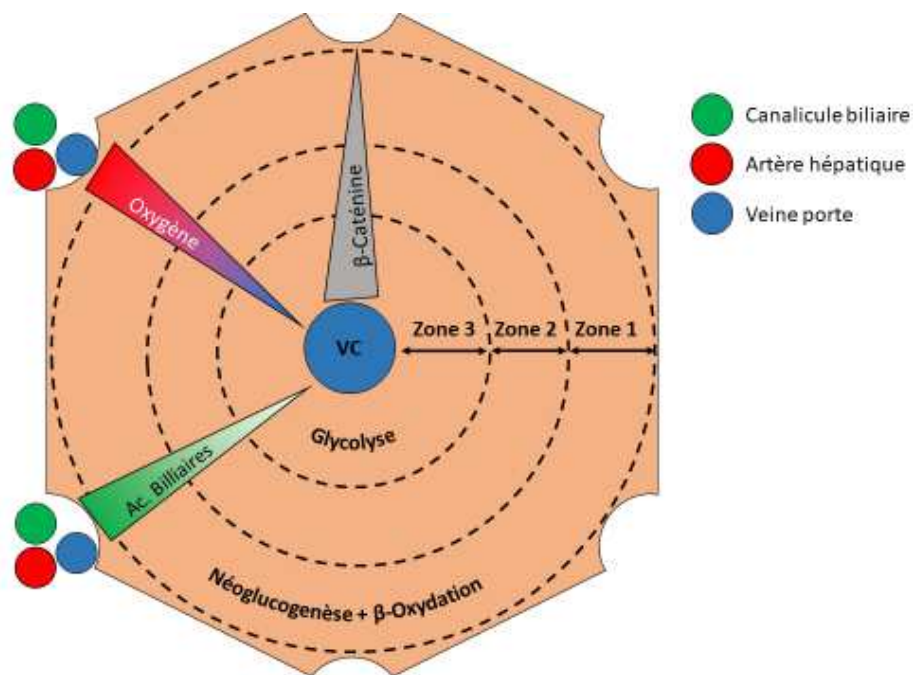


Figure 1 : Zonation d'un lobule hépatique.

La pression en O₂, comme la concentration en acides biliaires, décroît de la périphérie vers le centre du lobule hépatique et permet de décrire trois zones. La zone 1, périphérique, présente une activité importante des voies de la néoglucogenèse et de la β-oxydation. La zone 3, centrale, présente une forte activité glycolytique. L'activité des différentes voies est assurée par un gradient d'expression de la β-caténine allant du centre vers la périphérie du lobule. VC : veine centrale

Le système biliaire se collecte de l'intérieur du foie vers l'extérieur. Les différents canaux biliaires convergent en un conduit biliaire commun qui s'abouche dans l'ampoule bilio-pancréatique de Vater *via* le conduit cholédoque. Les canalicules biliaires sont bordés par des cellules particulières : les cholangiocytes.

La vésicule biliaire mesurant de 8 à 10 cm de long et 4 cm de diamètre constitue la voie biliaire accessoire. La vésicule se remplit à jeun et se vide au cours des repas.

2. Histologie

Le foie est composé de 80% d'hépatocyte et 20% d'autres cellules : cellules endothéliales, cellules de Kupffer, cellules Stellaires, cellules ovals et cholangiocytes (**Fig 2**).

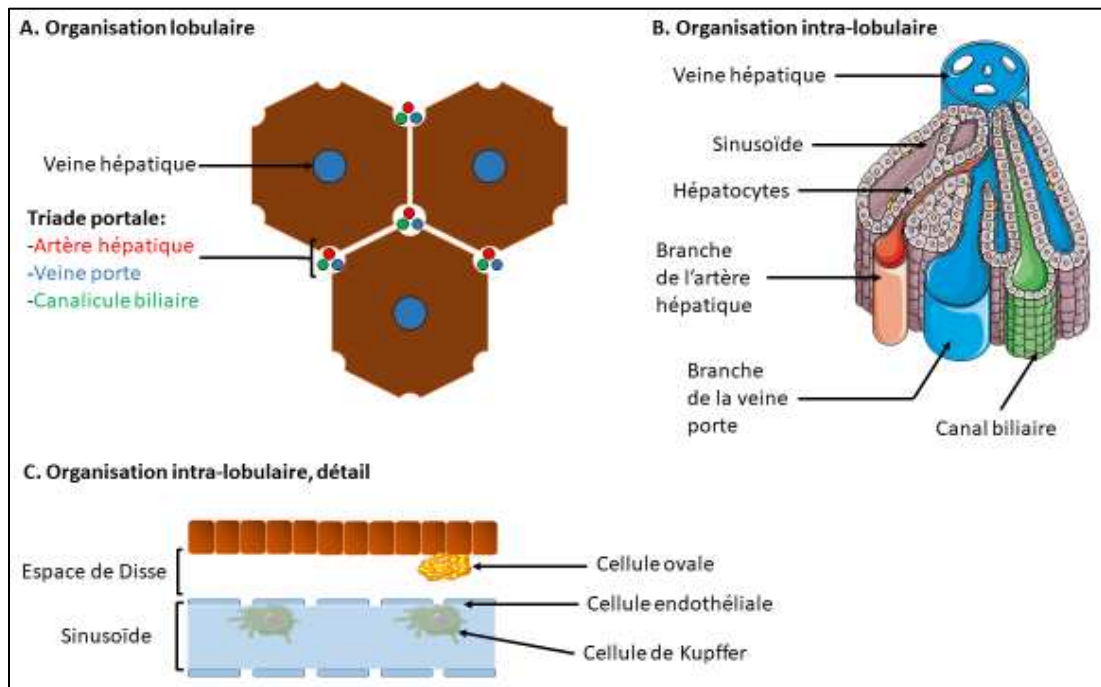


Figure 2 : Structure et organisation du foie.

A. Organisation en lobules. Chaque lobule est délimité en périphérie par la présence de six triades portales composées d'une artère hépatique, d'une veine porte et d'un canalicule biliaire. Au centre de chaque lobule se trouve une veine hépatique ou veine centrale. B. Organisation intra-lobulaire. Au sein d'un lobule les hépatocytes sont organisés en travées délimitant des capillaires sinusoides. C. Entre les hépatocytes et les capillaires sinusoides l'espace de Disse accueille les cellules ovals et les cellules stellaires. Les macrophages résidents du foie ou cellules de Kupffer sont localisés dans les sinusoides.

a) Les Hépatocytes

Les hépatocytes sont des cellules binucléées polyédriques et polarisées : leur pôle apical est au contact des canalicules biliaires et leur pôle basal est au contact des sinusoides. Leur durée de vie est de 200 jours chez le rat (MacDonald, 1961) et 300 jours chez l'homme. Dans un foie sain une forte proportion (60%) d'hépatocytes binucléés est observée. Le rôle de cette polyploidie pourrait être évolutif : le foie est constamment soumis à des agressions chimiques et/ou biologiques, augmenter le nombre de copies d'ADN permettrait donc de prévenir les dommages cellulaires occasionnés par les xénobiotiques (Duncan, 2013).

Il n'existe qu'un seul type d'hépatocyte mais l'expression des gènes diffère selon leur localisation (Braeuning et al., 2006) : proche de la veine porte les hépatocytes ont des fonctions oxydatives élevées (gluconéogenèse, β -oxydation, synthèse du cholestérol...) alors que ceux proches de la veine centrale vont permettre la dégradation des xénobiotiques, la synthèse des acides biliaires et la glycolyse. L'expression de ces différents gènes et enzymes est sous la dépendance de la voie *Wnt/ β -Caténine* (Benhamouche et al., 2006) (**Fig 1**).

En plus de leurs rôles dans le métabolisme des lipides, protéines et glucides, les hépatocytes ont de nombreuses autres fonctions.

1/ Synthèse des acides biliaires : Une des fonctions les plus connues du foie est la synthèse des acides biliaires à partir de cholestérol au cours d'une cascade biochimique faisant intervenir 17 enzymes (Russell, 2003). Grâce à la synthèse de ces composés les hépatocytes jouent un rôle dans l'absorption des lipides mais aussi dans le métabolisme du cholestérol. La bile synthétisée dans le foie est collectée dans la vésicule biliaire avant de rejoindre le tube digestif.

2/ Détoxification : Le foie et principalement les hépatocytes sont le lieu de détoxification des xénobiotiques notamment par les cytochromes P450 (CYP450). Ces enzymes permettent d'inactiver les xénobiotiques et de faciliter leur excrétion par voie biliaire.

3/ Métabolisme du fer : Le fer est un ion essentiel à la survie de notre organisme en intervenant dans de nombreuses réactions biochimiques mais aussi en permettant le transport de l'oxygène par les globules rouges. Les hépatocytes jouent un rôle majeur dans l'homéostasie du fer en permettant son stockage et sa détoxification grâce à la ferritine.

4/ Synthèse de facteurs sanguins : Le foie est le lieu de production de nombreux composants du sang comme l'albumine, le complément ou certains facteurs de coagulation, notamment le facteur VII, le fibrinogène et la pro-thrombine.

5/ Fonction « immune » : Les hépatocytes peuvent être considérés comme des cellules immune-like. En effet, ils expriment à leur surface de nombreux récepteurs canoniques de l'immunité comme le toll-like receptor 4 (TLR4) ou le récepteur pour les produits avancés de glycation (RAGE). Au cours de la phase aiguë d'un phénomène inflammatoire systémique et violent, les hépatocytes sont

capables de sécréter des protéines dites de phase aigüe. Parmi ces protéines on retrouve la protéine C-réactive (CRP), l'haptoglobine ou le fibrinogène (Crispe, 2016).

b) Les cellules endothéliales

Les cellules endothéliales des sinusoides du foie ou liver sinusoidal endothelial cells (LSECs) constituent un réseau capillaire extrêmement dense et fenêtré, sans lame basale, ce qui favorise les échanges (Wisse, 1970). Les LSECs sont responsables de l'endocytose des macromolécules et participent ainsi à leur clearance sanguine.

Le rôle le plus surprenant des LSECs est associé à la capacité régénérative du foie. Après une lésion hépatique (ex : hépatectomie partielle ou traitement au tétrachlorure de carbone, CCL₄) les cellules endothéliales vont servir de guides aux nouveaux hépatocytes pour restaurer la microarchitecture hépatique (Hoehme et al., 2010). Dans ces conditions, la prolifération et la migration des hépatocytes se fait sous le contrôle de facteurs sécrétés par les cellules endothéliales : le facteur de croissance hépatocytaire ou HGF (hepatocyte Growth Factor) et le ligand Wnt2 (Ding et al., 2010).

c) Les cellules de Küppfer

Découvertes en 1876 par Karl Wilhelm Von Küppfer (Geerts, 2001), les cellules de Küppfer (CK) sont les macrophages résidents du foie localisés dans les capillaires sinusoides (**Fig 2C**). Au cours de l'embryogenèse les CK proviennent du sac vitellin (Gomez Perdiguero et al., 2015). Dans des conditions basales, les CK dérivant du sac vitellin ne sont que peu remplacées par les monocytes circulants. Le maintien de la population de CK est assuré par des mécanismes d'auto-renouvellement indépendamment des monocytes circulants (Hashimoto et al., 2013).

Les CK constituent le système immunitaire résident du foie et constituent la première ligne de défense contre les pathogènes dérivés du système digestif, les CK sont aussi responsables de l'endocytose de débris cellulaires produits au cours d'épisodes nécrotiques périphériques ou hépatiques. Pour cela les CK expriment à leur surface un grand nombre de pattern recognition receptors (PRR) comme les TLR4 et 9, les récepteurs au mannose ou les NOD-like receptors (NLR). L'activation de ces récepteurs par leurs ligands respectifs ou l'endocytose des particules va permettre l'activation des CK (Canbay et al., 2003).

Les CK activées vont induire, comme les macrophages, une réponse immune en sécrétant des cytokines pro-inflammatoires comme le tumor necrosis factor α (TNF- α) ou la high mobility group box 1 protein (HMGB1), mais aussi des chimiokines comme le chemokine ligand 2 (CCL2).

Les CK jouent un rôle clef au cours des lésions aiguës du foie, comme lors d'une intoxication au paracétamol (N-acétyl-para-aminophénol, APAP). Le paracétamol est normalement détoxifié par les hépatocytes, en cas de surdosage, les systèmes de détoxification sont dépassés et un métabolite toxique s'accumule, entraînant la nécrose des hépatocytes. Chez les patients, une intoxication au paracétamol est responsable du développement d'une hépatite fulminante.

L'utilisation d'un modèle murin d'overdose de paracétamol permet de mettre en évidence le rôle des CK dans les agressions hépatiques aiguës. En effet, pendant les phases précoces (0h-24h) de l'intoxication la proportion de CK diminue suite à une infiltration de monocytes circulants recrutés suite à la nécrose des hépatocytes. Durant cette phase, les CK et les monocytes ont un phénotype pro-inflammatoire. Puis, dans les phases tardives (72h-120h), les CK s'auto-renouvellent et ont un phénotype anti-inflammatoire, ce qui permet de favoriser la réparation du tissu (Zigmond et al., 2014).

La fibrose hépatique, résultant de mécanismes cicatriciels incontrôlés, est la conséquence physiopathologique des affections chroniques du foie. Ce terrain fibrotique est favorable au développement d'un carcinome hépatocellulaire (CHC). Dans ce contexte d'agression chronique les CK jouent un double rôle. En effet, les CK peuvent activer les myofibroblastes, cellules responsables de la synthèse de la matrice extracellulaire (MEC), par la sécrétion de facteurs de croissance comme le transforming growth factor beta 1 (TGF β 1) et le platelet-derived growth factor (PDGF). Dans le même temps, les macrophages résidants secrètent des protéases responsables de la dégradation de la MEC (Ramachandran and Iredale, 2012). Ainsi, l'installation de la fibrose hépatique résulte d'un déséquilibre très subtil dans le contrôle des dépôts de MEC par les macrophages.

d) *Les cellules Stellaires*

Les cellules stellaires (CS) ou cellules hépatiques étoilées ont été découvertes par Küpffer en 1876 puis ont été décrites comme des cellules de stockage de gras (fat-storing) par l'anatomiste Japonais Toshio Ito en 1951. Elles représentent jusqu'à 8% des cellules hépatiques (Wake, 1980).

Ces cellules ont deux grandes fonctions :

- 1/ Le stockage de la vitamine A : les cellules stellaires regroupent à elles seules 90 à 95% des stocks de vitamine A de l'organisme. La vitamine A est stockée sous forme d'acide rétinoïque dans des vacuoles lipidiques cytoplasmiques spécifiques des cellules stellaires (Blomhoff and Blomhoff, 2005).

- 2/ La synthèse de matrice extracellulaire : lors de leur activation, suite à une lésion hépatique ou un signal pro-inflammatoire, les cellules stellaires sont capables de se différencier en myofibroblastes. A ce stade, les cellules stellaires activées sont capables de synthétiser de la matrice extracellulaire. Suite à une agression aiguë, les CS sont impliquées dans les phénomènes de cicatrisation et de prolifération des hépatocytes (Passino et al., 2007).

Au cours de la régénération hépatique, les cellules stellaires pourraient subir un phénomène de transition épithélio-mésenchymateuse et se différencier en hépatocytes. Ainsi ces cellules pourraient être des progéniteurs épithéliaux dans le foie adulte (Kordes et al., 2014; Yang et al., 2008a).

e) *Les cellules ovales*

La capacité de régénération unique du foie sous-entend la présence des cellules progénitrices au sein du tissu : les cellules ovales (**Fig 2**).

Les cellules ovales, localisées au niveau des canaux biliaires terminaux, ont la capacité de se différencier en hépatocytes. Ainsi, la partie terminale de canaux biliaires constituerait la niche des cellules progénitrices hépatiques (Paku et al., 2001).

Cependant, en condition normale, il semblerait que le renouvellement des hépatocytes soit assuré par la division des hépatocytes préexistants (Malato et al., 2011). Dans le cadre d'une agression aiguë, les nouveaux hépatocytes ne dérivent pas des cellules ovales mais pourraient provenir de la division des cellules déjà existantes, le même phénotype est observé lors d'une hépatectomie partielle (Furuyama et al., 2011; Malato et al., 2011). En revanche lors d'une agression chronique, les néo-hépatocytes semblent provenir des cellules ovales (Malato et al., 2011).

Tous ces résultats suggèrent que les mécanismes mis en jeu lors de la régénération hépatique sont différents en fonction de la durée de l'agression. Lors d'une agression aiguë, la régénération est assurée par la division des hépatocytes préexistants qui retournent donc dans le cycle cellulaire (Furuyama et al., 2011; Malato et al., 2011). Lors d'une agression chronique, la régénération du foie est assurée par la division des cellules ovales qui se différencient ensuite en hépatocytes.

f) *Les cholangiocytes*

Les cholangiocytes sont les cellules épithéliales bordantes des canaux biliaires. Leur rôle principal est de participer à la fabrication de la bile et à son avancée dans les canaux biliaires, à ce titre, les cholangiocytes possèdent un cil primaire au pôle apical (Huang et al., 2006). Grâce aux nombreuses jonctions serrées entre les cellules, les cholangiocytes assurent l'étanchéité du système biliaire (Ishii et al., 1989).

Les cholangiocytes et les hépatocytes dérivent de la même cellule embryonnaire : l'hépatoblaste. La différenciation hépatoblaste → hépatocyte suit un programme de différenciation « par défaut » alors que la différenciation hépatoblaste → cholangiocyte se fait via une branche régulée du programme de différenciation hépatoblaste → hépatocyte (Yang et al., 2017).

3. Les hépatokines

Le foie, comme le tissu adipeux et le muscle, est capable de sécréter des messagers hormonaux appelés hépatokines.

Les hépatokines sont des messagers endocrines dont les tissus cibles sont divers et capables d'influer sur le métabolisme gluco-lipidique (**tableau 1**).

Angiopietin-related growth factor 6 (ANGPTL6) : le foie est l'organe qui exprime majoritairement l'ANGPTL6 et qui contribue majoritairement aux taux plasmatiques. En ce sens, ANGPTL6 peut être considérée comme une hépatokine.

Chez l'Homme les concentrations circulantes d'ANGPTL6 sont élevées chez les patients atteints d'un diabète de type 2 et sont corrélées à la glycémie à jeun (Ebert et al., 2009).

Dans un modèle murin, la délétion d'ANGPTL6 favorise le développement de l'obésité et d'une insulino-résistance associée. L'apparition de cette obésité spontanée peut s'expliquer par une diminution globale de la dépense énergétique. Ainsi, l'ANGPTL6 peut être considérée comme une hépatokine pouvant limiter l'insulino-résistance associée à l'obésité (Oike et al., 2005).

Fetuin-A : la fetuin-A est une glycoprotéine majoritairement exprimée et sécrétée par le foie. C'est la première hépatokine identifiée en 1989 comme étant un inhibiteur de la signalisation insuline dans le foie et le muscle (Auberger et al., 1989). Son rôle sur la signalisation insuline est confirmé en 2002 : des animaux délétés pour la fetuin-A présentent une sensibilité à l'insuline accrue ainsi qu'une

résistance à l'obésité (Mathews et al., 2002). Ces résultats suggèrent que la fetuin-A pourrait avoir un rôle majeur dans la régulation de la glycémie.

Chez l'homme il existe une association entre les concentrations circulantes de fetuin-A et des composants du syndrome métabolique comme les triglycérides circulants ou les taux de cholestérol-HDL (Ix et al., 2006).

De plus, la stéatose hépatique et la résistance à l'insuline sont associées à une augmentation de l'expression de la fetuin-A aussi bien chez l'Homme que chez le rat (Stefan et al., 2006).

L'ensemble des données collectées jusqu'à présent démontrent que la fetuin-A est une hépatokine importante dans le développement des maladies métaboliques et de la stéatose hépatique non alcoolique.

FGF21 (Fibroblast growth factor 21) : FGF21 est l'une des hépatokines la plus étudiée et la mieux caractérisée à l'heure actuelle. Découverte en 2000, ce membre de la famille des facteurs de croissances fibroblastiques est majoritairement exprimé par les hépatocytes (Nishimura et al., 2000). En 2005, la première étude portant sur les effets métaboliques de FGF21 est publiée, elle démontre que ce facteur circulant favorise l'entrée du glucose dans les adipocytes de façon insulino-indépendante, et son administration à des souris génétiquement obèses (souris *ob/ob* ou *db/db*) permet de normaliser la glycémie et la triglycéridémie. L'amélioration des paramètres plasmatiques serait due à une augmentation de la dépense énergétique des souris traitées avec du FGF21 (Kharitonov et al., 2005). Publiés en 2007, les travaux des groupes de Maratos-Flier et Kliewer ont permis de démontrer que l'hépatokine FGF21 favorise l'utilisation des lipides notamment lors du jeûne ou d'un régime cétogénique. Au cours de ces périodes de carences énergétiques, l'expression hépatique et les concentrations circulantes de FGF21 sont augmentées par un mécanisme PPAR α dépendant. Cette hépatokine participe à la mise en place de boucles autocrine et endocrine, en favorisant la β -oxydation et synthèse de corps cétoniques par le foie ainsi que l'entrée du glucose dans les tissus périphériques (Badman et al., 2007; Inagaki et al., 2007). Ces résultats sont confirmés par l'incapacité des animaux déficients en *Fgf21* (FGF21KO) à adapter leur métabolisme lors d'un régime cétogénique : contrairement aux animaux contrôles, les animaux FGF21KO gagnent du poids et présentent une hyperglycémie associée à une lipémie augmentée.

Chez des patients atteints de diabète de type 2 associé à l'obésité, les taux circulants de FGF21 sont plus élevés comparativement à des patients normo-pondérés et non diabétiques (Chen et al., 2008). Une étude conduite chez des jumeaux a montré que les individus avec des concentrations circulantes de FGF21 plus élevées présentaient une insulinémie, une triglycéridémie à jeun, une sensibilité à

l'insuline et une aire sous la courbe au cours d'une hyperglycémie provoquée par voie orale, augmentées. En revanche, la comparaison de jumeaux entre eux révèle que les taux de FGF21 circulants sont associés à la graisse hépatique plutôt qu'à la graisse sous cutanée ou viscérale (Tynismaa et al., 2011), ainsi, FGF21 serait plus un marqueur de la stéatose hépatique que de l'obésité globale.

Le FGF21 plasmatique a été proposé comme marqueur du bon fonctionnement des hépatocytes, car d'une part les concentrations plasmatiques reflèteraient la production hépatique, et d'autre part le foie en conditions de stress pathologiques (stéatohépatite, cirrhose, hépatocarcinome) produit du FGF21 en plus grande quantité (Yang et al., 2013).

Insulin-like growth factor 1 (IGF-1) : les IGFs sont une superfamille de facteurs de croissance présentant une forte homologie structurelle et fonctionnelle avec l'insuline.

IGF-1 est exprimé dans de nombreux tissus, cependant, la majorité de l'IGF-1 circulant provient des hépatocytes, à ce titre, l'IGF-1 peut être considéré comme une hépatokine.

Dans la circulation sanguine, l'IGF-1 est associé à une protéine de transport : l'IGF binding protein (IGFBP). Ces protéines constituent un réservoir d'IGF dans la circulation sanguine et permettent aussi le transport et la régulation des effets de l'IGF-1 au niveau des tissus périphériques (Stefan and Häring, 2013).

De façon intéressante, l'administration à l'Homme d'IGF-1 recombinant a des effets similaires à l'insuline sur la glycémie des sujets sains (Boulware et al., 1994) et permet d'améliorer la sensibilité à l'insuline et le contrôle de la glycémie chez des sujets diabétiques de type 2 (Moses et al., 1996).

Chez des sujets présentant une stéatose, les taux circulants d'IGF-1 sont diminués par rapport à des sujets contrôles (Arturi et al., 2011), ce résultat suggère que la concentration d'IGF-1 circulant pourrait être le reflet de la sensibilité hépatique à l'insuline et/ou du contenu hépatique en lipides.

Outre son rôle dans le métabolisme énergétique, l'IGF-1 joue aussi un rôle statural, en effet, la petite taille des pygmées serait due, entre autre, à une déficience en IGF-1 (Merimee et al., 1981).

Sélinoprotéine P (SEP) : la SEP est une protéine produite et sécrétée par le foie, impliquée dans le métabolisme du sélénium.

De façon intéressante, la régulation de l'expression de la SEP est semblable à celle des enzymes néoglucogéniques : son expression est induite par le glucose et inhibée par l'insuline, suggérant un lien fort entre le métabolisme glucidique et la sécrétion de SEP. En effet, les concentrations circulantes de SEP sont corrélées à la sévérité de la résistance à l'insuline, de plus, la concentration de SEP est

augmentée chez des patients atteints de diabète de type 2 comparativement à des sujets sains (Misu et al., 2010).

In vivo, l'administration de SEP induit une résistance à l'insuline chez la souris, et son inhibition par ARN interférant l'améliore. Dans le foie des souris, la phosphorylation de l'AMPK est diminuée après un traitement à la SEP, sans changement du ratio AMP/ATP, et l'AICAR (5-aminoimidazole-4-carboxamide-1- β -D-ribo-nucleoside), un analogue de l'AMP qui peut donc activer l'AMPK, permet de bloquer les effets délétères de la SEP sur la signalisation insuline d'hépatocytes en culture (Misu et al., 2010), faisant de l'AMPK une cible potentielle de la SEP. Le traitement d'hépatocytes de rat en culture avec la Metformine, un biguanide utilisé comme traitement antidiabétique, diminue l'expression et la sécrétion de la SEP (Speckmann et al., 2008) et cette diminution peut participer à l'amélioration de la sensibilité à l'insuline observée chez les patients traités avec la Metformine.

Sex hormone-binding globulin (SHBG) : la SHBG est principalement sécrétée par les hépatocytes (Khan et al., 1981). Depuis sa découverte dans les années 1980 jusqu'en 2009, son rôle dans la régulation du métabolisme est resté inconnu. En 2009, deux approches basées sur la randomisation Mendélienne ont pu mettre en évidence le rôle protecteur de la SHBG sur le développement du diabète de type 2 (Ding et al., 2009; Perry et al., 2010), les taux circulants de SHBG pourraient même être un outil prédictif dans le survenue du diabète de type 2.

Dans un modèle murin exprimant la SHBG humaine, un régime enrichi en glucose et fructose diminue l'expression de SHBG par un mécanisme HNF-4 α dépendant (Selva et al., 2007).

Une intervention dans le style de vie qui a pour effet de diminuer la stéatose peut augmenter les taux circulants de SHBG (Stefan et al., 2010). Malgré toutes les études parues à ce jour, les mécanismes d'action de la SHBG sont méconnus.

Hépatokine	Effets		
	Chez l'Homme	Chez l'animal ou la cellule	
Angiopietin-related protein 6	↑ Résistance à l'insuline	↑ Dépense énergétique ↓ Obésité ↓ Stéatose hépatique ↓ Résistance à l'insuline	Bénéfique
Fetuin-A	↑ Stéatose hépatique ↑ Résistance à l'insuline ↑ Inflammation de bas bruit ↑ Diabète de type 2 ↑ Maladies cardio-vasculaires	↑ Obésité ↑ Résistance à l'insuline ↑ Maladies cardio-vasculaires	Délétère
FGF-21	↑ Obésité ↑ Stéatose hépatique ↑ Résistance à l'insuline	↑ Dépense énergétique ↓ Résistance à l'insuline ↑ Survie des cellules β	Bénéfique
IGF-I	↑/↓ Résistance à l'insuline	↑/↓ Résistance à l'insuline	
Selenoprotein P	↑ Résistance à l'insuline ↑ Inflammation de bas bruit	↑ Résistance à l'insuline	Délétère
Sex hormone-binding globulin		↓ Obésité ↓ Stéatose hépatique ↓ Résistance à l'insuline ↓ Diabète de type 2 ↓ Atteintes cardio-vasculaires	Bénéfique

Tableau 1 : Tableau récapitulatif des effets et tissus cibles des principales hépatokines.
D'après Stefan et Haring (Stefan and Haring, 2013).

B. Le foie, un organe clef du métabolisme énergétique

Le foie est l'organe clef du métabolisme énergétique : en effet, en fonction des besoins de l'organisme il est capable de produire, stocker et libérer des substrats énergétiques. Ainsi, le foie est capable de stocker le glucose sous forme de glycogène (glycogénogenèse), de synthétiser du glucose *de novo* (néoglucogenèse) ou de l'utiliser pour la production d'énergie (glycolyse). Les lipides constituent l'autre substrat énergétique de l'organisme, le foie est capable de les stocker sous formes de triglycérides (TG), de les synthétiser (lipogenèse *de novo*, LDN) et de les sécréter dans la circulation sanguine sous forme de lipoprotéines de faible densité (VLDL). Enfin, les lipides peuvent être dégradés au cours de la β -oxydation pour produire de l'énergie. Lors de périodes de jeûne prolongé, le foie est capable de produire et d'exporter des substrats énergétiques, dérivés des lipides : les corps cétoniques (**Fig 3**).

1. Métabolisme glucidique hépatique

a) *Entrée du glucose dans l'hépatocyte*

L'entrée du glucose (et du fructose) dans l'hépatocyte se fait par le glucose transporter 2 (GLUT2). De façon surprenante, la délétion de *Glut2* dans l'hépatocyte permet le développement d'une intolérance au glucose secondaire à un défaut de sécrétion d'insuline par le pancréas. Ainsi, la détection du glucose par l'hépatocyte constitue un élément majeur du maintien de l'homéostasie glucidique (Seyer et al., 2013).

Les transporteurs GLUTs sont des protéines à douze hélices transmembranaires qui forment un pore transmembranaire perméable aux oses. GLUT2 a la particularité de permettre le transport du glucose de façon bidirectionnelle en fonction de sa concentration. L'expression et la fonction de ce transporteur sont indépendantes de l'insuline. Le foie est le premier organe rencontré par le glucose en provenance du tube digestif et l'entrée du glucose dans cet organe se fait de façon concentration dépendante ainsi, le foie constitue l'organe de stockage du glucose par excellence.

Dès que la glycémie augmente, le glucose entre dans les hépatocytes où il est phosphorylé par la glucokinase (GK). Le glucose-6-Phosphate (G6P) ainsi formé ne peut pas ressortir de la cellule.

Afin d'éviter qu'une hypoglycémie ne soit induite par une entrée massive de glucose dans l'hépatocyte, l'activité et l'expression de la GK sont étroitement contrôlées par l'insuline.

En période *post prandiale*, lorsque le glucose est abondant, les taux d'insuline sont élevés. Ces taux d'insuline élevés induisent l'expression de la GK de façon dose dépendante (Ilyedjian et al., 1989), la régulation de l'expression du gène de la GK passe notamment par le facteur de transcription sterol regulatory element-binding protein 1-c (SREBP1-c). En situation de jeûne, l'activité de la GK est inhibée par la glucokinase regulatory protein (GKRP) (Schafingen, 1989) : la GKPR séquestre la GK dans le noyau, lorsque la concentration de glucose intracellulaire augmente l'interaction GK-GKRP est rompue et la GK se retrouve dans le cytoplasme.

La phosphorylation du glucose constitue l'évènement majeur qui lui permet d'être métabolisé par la cellule hépatique.

Une fois dans l'hépatocyte, le glucose va pouvoir rejoindre différentes voies métaboliques : la voie de la glycolyse pour la production d'énergie, la voie de la glycogénogenèse pour la constitution de réserves énergétiques glucidiques ou la voie de la lipogénèse de novo (LDN) pour la constitution de réserves lipidiques.

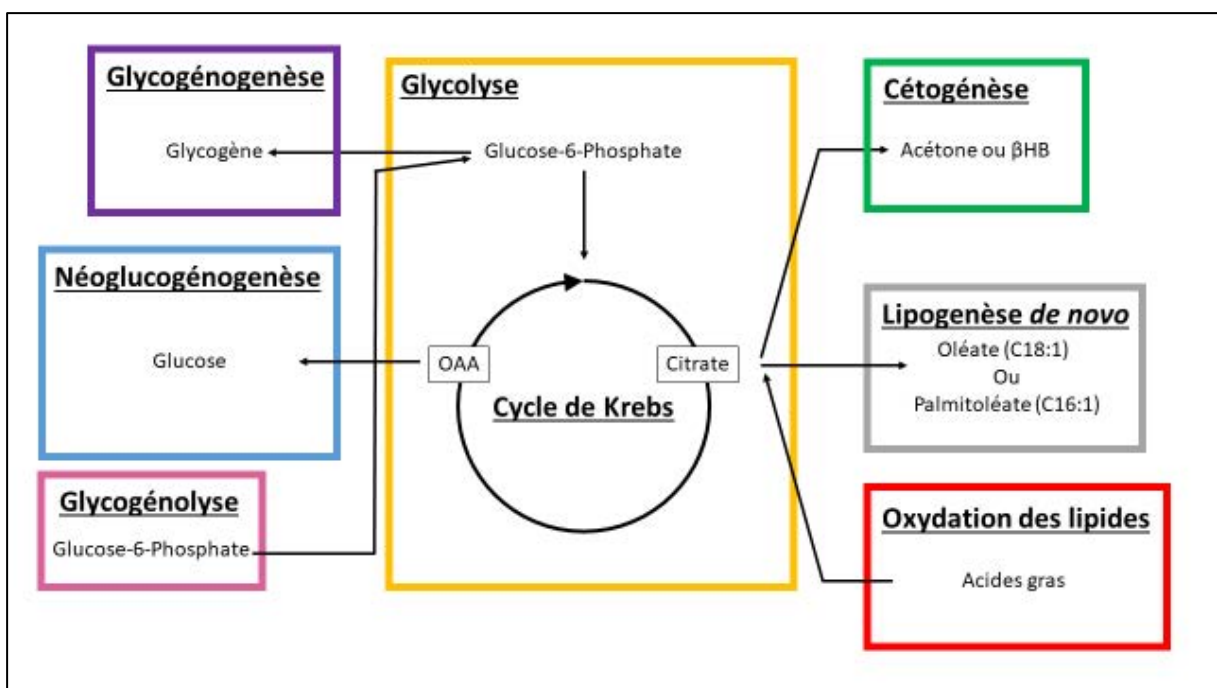


Figure 3 : Interaction des voies biochimiques hépatocytaires.

L'hépatocyte est une cellule capable de fournir de l'énergie au reste de l'organisme quel que soit le type de substrat disponible. Le cycle de Krebs, en fournissant des substrats aux autres voies biochimiques est au centre de cette flexibilité métabolique.

b) *Production d'énergie à partir du glucose : la glycolyse*

La glycolyse (voie d'Embden-Meyerhoff) ou voie des pentoses phosphates permet d'oxyder le glucose et de produire de l'ATP et du pyruvate (**Fig 4**).

Cette cascade biochimique, qui peut avoir lieu dans la majorité des organes, se déroule dans deux compartiments cellulaires distincts : la première partie a lieu dans le cytoplasme et la seconde prend place dans la mitochondrie.

La première phase, cytoplasmique, comporte huit réactions permettant la formation de pyruvate à partir de glucose.

Après sa formation dans le cytoplasme, le G6P est converti en Fructose-6-Phosphate (F-6-P) par la Phosphoglucose Isomérase. Le F-6-P est ensuite converti en Fructose-1,6-bis-Phosphate (F-1,6-P) par la Phosphofructokinase (PFK). Le clivage du F-1,6-P génère deux molécules à trois carbones : le 3-phospho-glycéraldéhyde (3-PG) et le dihydroxyacétone phosphate (DHAP), ce dernier est isomérisé par la triose phosphate isomérase en 3-PG.

Chaque 3-PG est converti en 1,3-bis-phosphoglycérate par la phosphoglycérate hydrogénase puis en 3-phosphoglycérate par la phosphoglycérate kinase. La phosphoglycérate mutase permet de générer un 2-phosphoglycérate, puis sous l'action de l'énolase, du phosphoenolpyruvate (PEP) est généré. Finalement, le PEP est converti en pyruvate sous l'action de la pyruvate kinase (PK).

Le pyruvate est transporté dans la mitochondrie par le transporteur mitochondrial du pyruvate (TMP), en présence d'ions K^+ . Une fois dans la mitochondrie, le pyruvate est oxydé et décarboxylé par le complexe pyruvate déshydrogénase (PDH) pour donner de l'acétyl-CoA. L'acétyl-CoA entre dans le cycle de Krebs qui permet par des réactions d'oxydo-réductions de générer un gradient d'ions H^+ . Ce gradient d'ion permet d'entraîner un enzyme : l'ATP-synthase qui permet de générer de l'ATP à partir d'ADP.

Ce processus catabolique est activé par l'insuline qui est responsable de la déphosphorylation des PFK, PK et PDH, le glucagon freine leur activité en induisant leur phosphorylation.

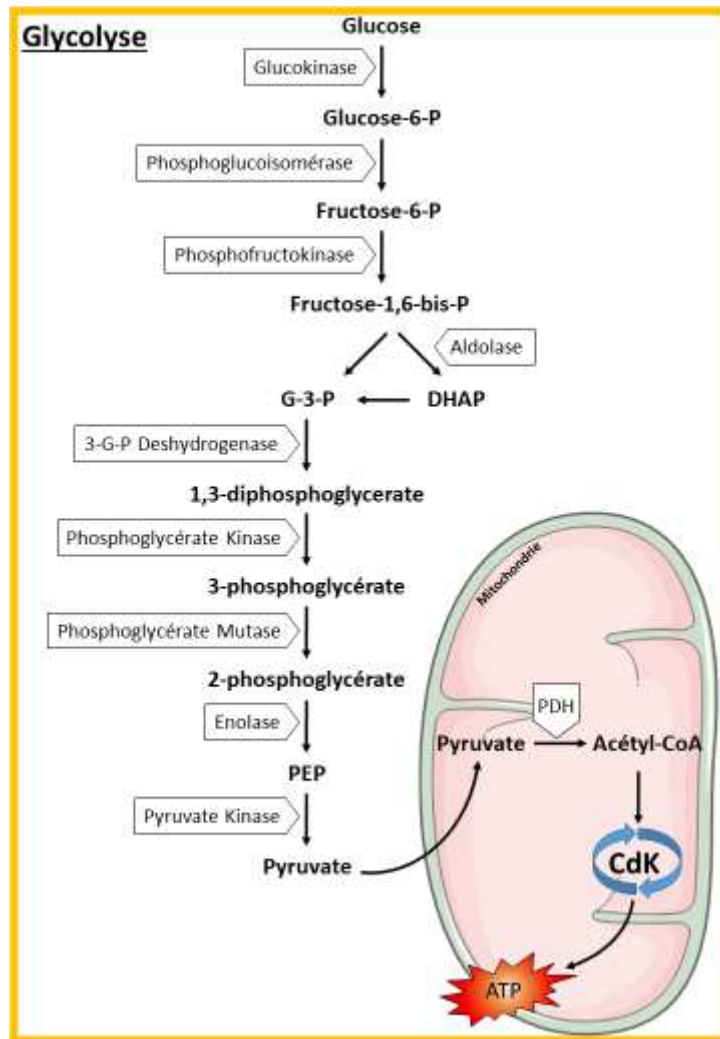


Figure 4 : La glycolyse hépatique.

Dès son entrée dans l'hépatocyte, le glucose est converti en glucose-6-phosphate, qui va devenir, après une suite de réaction enzymatique, une molécule de pyruvate. Le pyruvate est converti, dans la mitochondrie, en acétyl-CoA utilisé pour générer de l'ATP grâce au cycle de Krebs. G-3-P: glycéro-3-phosphate, DHAP: dihydroxyacétone phosphate, PEP: phosphoénol-pyruvate, PDH : pyruvate déshydrogénase, CdK : cycle de Krebs.

c) *Stockage d'énergie à partir du glucose : la glycogénogenèse*

La glycogénogenèse est une voie biochimique permettant de former un polymère ramifié de glucoses liés en $\alpha 1-4$ avec des ramifications en $\alpha 1-6$: le glycogène (**Fig 5**). Cette macromolécule est la « matière glycogène » décrite par Claude Bernard dans les années 1850 (Bernard, 1853).

La constitution de tels polymères permet de rendre osmotiquement inactif le glucose et ainsi de créer des stocks beaucoup plus importants. Une fois synthétisé, le glycogène est stocké dans le cytoplasme sous forme de granules de 20 à 30nm appelés glycosomes (Rybicka, 1996).

Pour être ajouté au polymère, le G6P doit être converti en uridine-di-phosphate-glucose (UDP-Glucose). Le G6P est converti en glucose-1-phosphate (G1P) sous l'action de la phosphoglucomutase (PGM). Le G1P est combiné à un uridine-tri-phosphate (UTP) pour donner de l'UDP-Glucose sous l'action de l'UDP-Glucose-phosphorylase. L'UDP-Glucose est finalement ajouté au glycogène préexistant par la glycogène synthase (GS). Au terme de sa synthèse, une molécule de glycogène peut contenir jusqu'à 30 000 glucoses.

Les branchements α 1-6 sont réalisés par la glycosyl-4,6-tansferase.

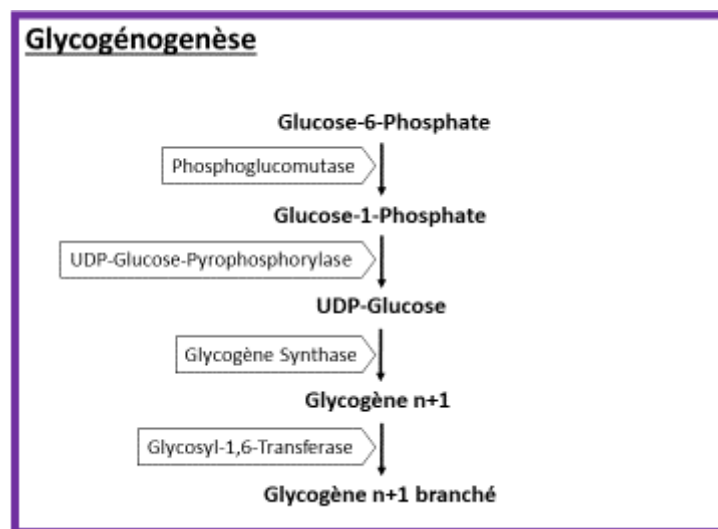


Figure 5 : La glyco-génogenèse hépatique.

La glyco-génogenèse permet la formation et l'élongation du glycogène. Le glucose-6-phosphate est « activé » par ajout d'une uridine. L'UDP-glucose ainsi généré est ajouté au glycogène suite à l'action de la glycogène synthase. Le glycogène peut être ramifié suite à l'action de la glycosyl-1,6-transferase. UDP : uridine di-phosphate.

La synthèse de glycogène est régulée soit par le G6P qui permet une activation allostérique de la GS soit par des messagers hormonaux. En effet, la balance insuline/glucagon favorise la synthèse ou la dégradation du glycogène : en présence de fortes concentrations d'insuline, la GK est activée ce qui permet une synthèse de glycogène augmentée.

En revanche, en période de jeûne, les taux d'insuline sont effondrés et ceux de glucagon augmentent. L'augmentation des concentrations de glucagon va permettre d'activer la cascade de dégradation du glycogène : la glyco-génolyse (**Fig 6**). Cette cascade commence par l'hydrolyse du glycogène par la glycogène phosphatase (GP) et la libération du G1P. Sous l'action de la PGM, le G1P est converti en G6P pouvant être soit exporté hors de l'hépatocyte après action de la glucose-6-phosphatase (G6Pase) ou dirigé vers les autres voies biochimiques de l'utilisation du glucose.

La synthèse de glycogène est aussi régulée de façon insulino-indépendante par le fibroblast growth factor 19 (FGF19 ; aussi appelé FGF15 chez le rongeur). FGF19 fait partie de la super famille des FGFs qui gouverne le métabolisme nutritionnel.

FGF19 est une entérokinine sécrétée dans la circulation sanguine suite à la capture des acides biliaires par l'entérocyte ayant comme fonction première de participer à la régulation de la synthèse des acides biliaires par l'axe entéro-hépatique (Inagaki et al., 2005).

A l'état basal, l'activité de la GS est inhibée par la glycogène synthase kinase-beta (GSK3 β). La liaison de FGF19 sur son récepteur (FGFR4- β Klotho) entraîne la levée de cette inhibition et l'activation de la synthèse de glycogène.

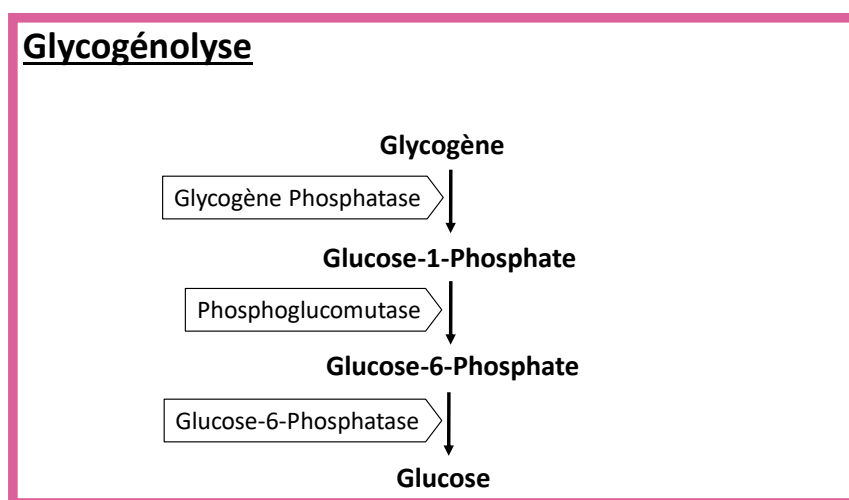


Figure 6 : La glycogénolyse hépatique

Le glycogène est dégradé par l'action de la glycogène phosphatase qui permet la libération d'un glucose-1-phosphate. La phosphoglucomutase permet la conversion du glucose-1-phosphate en glucose-6-phosphate. L'action de la glucose-6-phosphatase permet la libération d'un glucose.

d) La néoglucogenèse

La néoglucogenèse (NGG) permet de synthétiser du glucose à partir de résidus non glucidiques (**Fig 7**). Chez les mammifères, la NGG a lieu majoritairement dans le foie et permet de maintenir la glycémie stable lorsque les stocks de glycogènes sont épuisés, lors d'un jeûne prolongé ou d'un exercice physique.

La formation de glucose s'opère à partir d'acides aminés glucoformateurs comme le pyruvate ou le lactate provenant de la circulation générale.

Dans le cas du pyruvate, la pyruvate carboxylase va produire un oxaloacétate (OAA) qui sera converti en PEP sous l'action de la PEP-carboxykinase (PEPCK). Le PEP, grâce à des réactions inverses à celles de la glycolyse va pouvoir être transformé en glucose, puis libéré dans la circulation sanguine.

Le lactate qui provient majoritairement de la contraction musculaire est converti en pyruvate sous l'action de la lactate déshydrogénase avant de rejoindre la voie classique de la NGG.

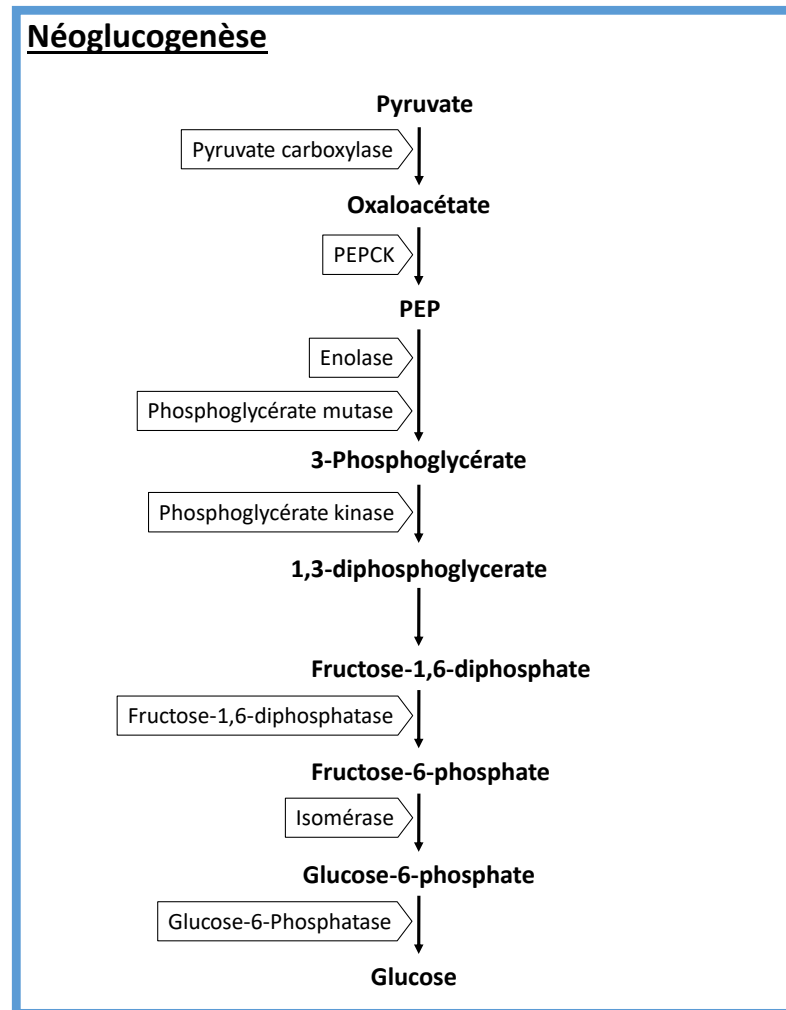


Figure 7 : La néoglucogénèse hépatique.

Le pyruvate est transformé en oxaloacétate, pris en charge par la PEPCK pour former une molécule de PEP. Plusieurs réactions enzymatiques permettent la formation d'un fructose-1,6-biphosphate qui, après l'action de la fructose-1,6-biphosphatase et d'une isomérase, devient un glucose-6-phosphate, puis un glucose après l'action de la G-6-Pase. PEP: phosphoénol-pyruvate, PEPCK: PEP carboxykinase.

L'activité de cette voie est sous la dépendance de l'activité de la PEPCK : en présence de glucose, la PEPCK est acétylée par l'acétyl-transférase p300 ce qui conduit à son ubiquitinylation et à sa dégradation par le protéasome (Jiang et al., 2011). D'une façon plus générale, l'ensemble des enzymes du métabolisme sont régulées par de acétylations ce qui suggèrent que ce type de

modifications post traductionnelles joue le rôle de senseur de l'état énergétique de la cellule (Zhao et al., 2010b).

La voie de la NGG est activée suite à une période de jeûne prolongée, c'est-à-dire lorsque les taux circulants de glucagon sont les plus élevés. Le glucagon en se fixant à son récepteur induit une cascade de signalisation aboutissant à la production d'AMP cyclique (AMPC) et l'activation du facteur de transcription cAMP Response Element Binding Protein (CREBP). CREBP est capable d'induire directement l'expression de la PEPCCK en se fixant sur son promoteur mais aussi indirectement en permettant l'activation du Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha (PGC1a) (Herzig et al., 2001).

La balance entre NGG et glycolyse est finement régulée par l'insuline et le facteur de transcription forkhead box protein O1 (FOXO1). En condition basale, le dimère FOXO1-SIN3A est présent sur le promoteur de la GK et inhibe son expression. Dans cette même condition, FOXO1 favorise l'expression de la glucose-6-phosphatase. En présence d'insuline, SIN3A quitte le noyau et la transcription de la GK est induite alors que celle de la G6Pase est inhibée (Langlet et al., 2017).

2. Métabolisme lipidique hépatique

Chez les mammifères il n'existe qu'un seul tissu de stockage à long terme des lipides : le tissu adipeux. Le foie, en condition physiologique, stocke les lipides de façon transitoire : ils seront utilisés ou secrétés lors des périodes de jeûne sous forme de very low density lipoprotein (VLDL).

Il existe trois sources de lipides : l'alimentation, les lipides provenant de la lipolyse du tissu adipeux et les lipides produits par la voie de la lipogenèse *de novo* hépatique.

a) *Entrée des lipides dans l'hépatocyte*

Les lipides alimentaires vont être absorbés au niveau de l'entérocyte avant d'être secrétés dans la circulation sanguine au sein de chylomicrons.

La lipoprotéine lipase (LPL) est une enzyme présente dans de nombreux tissus et notamment à la surface des capillaires sinusoides péri-portaux du foie (Camps et al., 1991). La LPL hydrolyse les TG contenus dans les chylomicrons pour donner des acides gras libres (AGL).

L'entrée des AGL dans l'hépatocyte se fait en fonction de leur concentration soit par diffusion passive au travers de la membrane des hépatocytes soit par les transporteurs spécifiques fatty acid transport protein (FATP) ou fatty acid translocase (FAT, CD36). Une fois dans l'hépatocyte, les acides gras à longue chaîne (14 carbones ou plus) sont pris en charge et activés soit par la fatty acid binding protein (FABP) soit par l'acylCoA synthétase (ACS) (Nguyen et al.).

Les acides gras libres liés à la FABP vont pouvoir être transloqués dans le noyau pour réguler l'expression des gènes. En effet, de nombreux facteurs de transcriptions régulant l'expression des gènes du métabolisme ont pour ligands endogènes des lipides ou dérivés lipidiques. A titre d'exemple, les acides gras polyinsaturés de la famille des Ω 3, C20 et C22, peuvent agir sur le sterol regulatory element-binding protein 1c (SREBP 1c) ou le liver-X receptor α (LXR α) pour supprimer la lipogénèse. Ces acides gras peuvent aussi augmenter la β -oxydation en activant le peroxysome proliferative activating receptor α (PPAR α) (Jump, 2002). Le récepteur PPAR γ pourrait être activé par certains lipides oxydés ou des prostaglandines (Itoh et al., 2008).

La liaison à FABP ou ASC permet « l'activation » des acides gras, ce qui les rend métabolisables par la cellule, soit pour entrer dans les voies de synthèses des TG ou des phospholipides, soit pour produire de l'énergie par oxydation.

b) Production d'énergie à partir des lipides

En conditions de jeûne, le foie est capable d'oxyder les lipides pour produire de l'énergie sous forme d'ATP ou de corps cétoniques. Les corps cétoniques sont des dérivés d'acides gras utilisés par tous les organes et notamment le cerveau pour produire de l'énergie en situation de jeûne prolongé.

(1) Les β -oxydations

La dégradation des acides gras se fait dans deux compartiments cellulaires bien distincts : le peroxysome ou la mitochondrie (**Fig 8**). Le choix de l'organelle se fait selon la nature des acides gras : les acides gras à très longue chaîne (VLCFA) sont oxydés dans le peroxysome alors que les acides gras à chaîne moyenne ou courte sont principalement oxydés dans la mitochondrie.

Quelle que soit leur nature les AG doivent être activés, c'est-à-dire conjugués à un acétyl-CoA par l'acyl-CoA synthase. Leur passage au travers des membranes des organites se fait *via* les carnitine-acyltransférases peroxysomale et mitochondriale.

(a) β -oxydation peroxysomale

Les peroxysomes sont des organites cytoplasmiques dont la taille varie de 0,1 à 1 μ m, spécialisés dans le métabolisme des acides gras et des acides aminés, particulièrement abondants dans les hépatocytes.

La β -oxydation peroxysomale requière l'activité de trois enzymes : l'acyl-CoA oxydase, l'enzyme bi-fonctionnelle enoyl-CoA hydratase/hydroxyacyl-CoA déshydrogénase et la ketoacyl-CoA thiolase (Reddy and Hashimoto, 2001).

La β -oxydation peroxysomale ne produit pas d'énergie à proprement parler mais produit de l'acyl-CoA métabolisable par le cycle de Krebs.

(b) β -oxydation mitochondriale

La β -oxydation mitochondriale a lieu dans la matrice mitochondriale. Le transfert de l'acyl-CoA du cytoplasme vers la matrice se fait par la navette de la carnitine : dans un premier temps, l'acyl-CoA est converti, par la carnitine palmitoyl transferase 1a (CPT1a), en acyl-carnitine qui diffuse dans l'espace inter-membranaire par une porine. Le passage dans la matrice mitochondriale est couplé à l'export de carnitine et se fait sous l'action de la CACT (carnitine-acylcarnitine transferase), une fois dans la matrice, l'acyl-carnitine est converti en acyl-CoA par la carnitine palmitoyl transferase 2 (CPT2).

La dégradation des acides gras fait intervenir quatre réactions. La première réaction voit la conversion de l'acyl-CoA en trans- Δ^2 -Enoyl-CoA sous l'action de l'Acyl-CoA déshydrogénase. La seconde étape est catalysée par l'enoyle-CoA hydratase et permet de générer un β -hydroxyacyl-CoA. L'oxydation du β -hydroxyacyl-CoA par la 3-hydroxyacyl-CoA déshydrogénase permet la formation de β -cétoacyl-CoA. La dernière étape permet la dégradation du cétoacyl-CoA en Acétyl-CoA avec la production d'un acyl-CoA. Ces réactions s'enchainent jusqu'à ce que toute la chaîne carbonée soit « découpée » en acétyl-CoA. Ces quatre réactions constituent un tour de l'hélice de Lynen : chaque tour permet de raccourcir l'acide gras de deux atomes de carbone en produisant un acétyl-CoA ainsi qu'une molécule de FADH₂ et une de NADH.

Les électrons à fort potentiel du FADH₂ et du NADH permettent d'entraîner l'ATP synthase et de produire de l'énergie sous forme d'ATP.

L'acétyl-CoA généré rejoint soit le cycle de Krebs pour y être oxydé et générer de l'ATP soit la voie de la cétogenèse en condition de jeûne long. L'acétyl-CoA est également le substrat privilégié de la voie de la lipogénèse *de novo*.

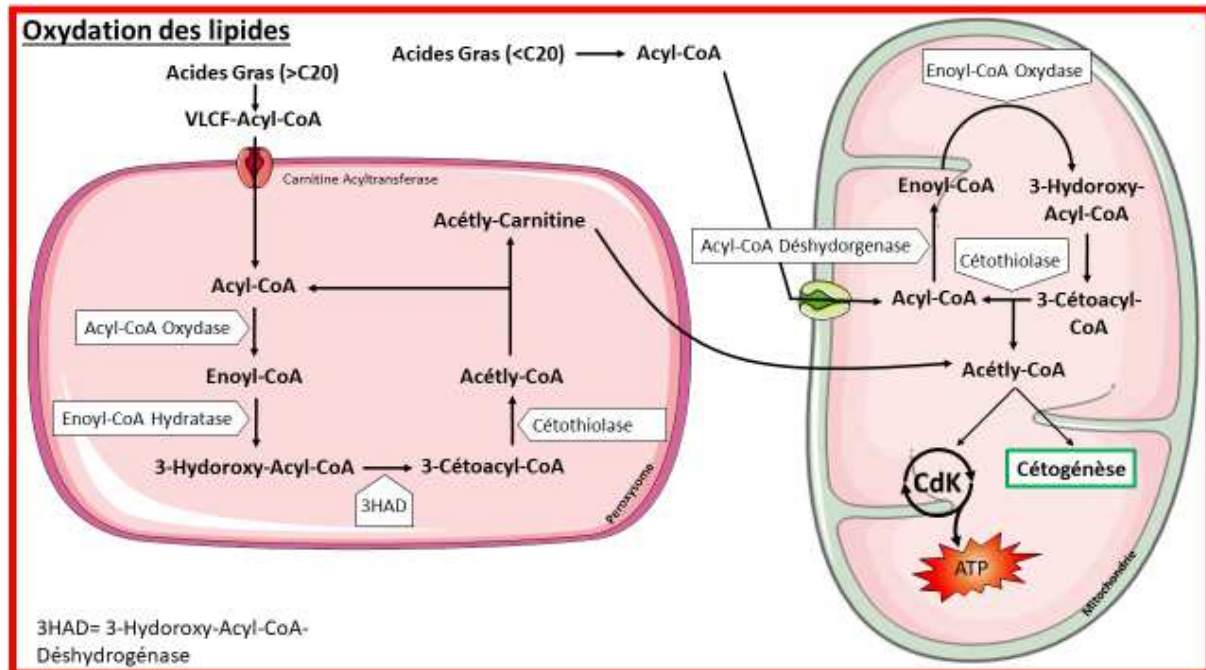


Figure 8 : Oxydation des lipides dans l'hépatocyte.

Dans le peroxysome, l'entrée des acyl-coA à très longue chaîne (VLCFA-coA) se fait grâce à la carnitine acyltransférase peroxysomale. L'acyl-coA oxydase génère un énoyl-coA, pris en charge par une énoyl-coA hydratase qui génère un 3-hydroxyacyl-coA. Une molécule de 3-cétoacyl-coA est produite après l'action d'une 3-hydroxyacyl-coA déshydrogénase (3HAD), puis la céthiolasé génère un acyl-coA, réduit de deux carbones, qui subit les mêmes réactions, et un acétyl-coA qui est transformé en acétyl-carnitine. Cet acétyl-carnitine peut entrer dans la mitochondrie pour générer de l'énergie en entrant dans le cycle de Krebs. Les acyl-coA possédant moins de 20 carbones entrent dans la mitochondrie par la CPT1a et arrivent dans la matrice mitochondriale. L'acyl-coA déshydrogénase génère un énoyl-coA, qui est transformé par l'énoyl-coA oxydase en un 3-hydroxyacyl-coA. L'hydroxyacyl-coA déshydrogénase génère un 3-cétoacyl-coA. La céthiolasé génère alors un acyl-coA réduit de deux carbones, et un acétyl-coA, qui entre dans le cycle de Krebs (CdK) puis dans la chaîne respiratoire où l'ATP est formée. L'acétyl-coA est également le substrat de la cétogenèse en condition de jeûne prolongé.

CPT1 est considéré comme l'enzyme limitante de la β -oxydation. L'activité de cette enzyme est inhibée par le malonyl-CoA produit par l'ACC2 au cours de la première étape de la LDN (Brindle et al., 1985). Par ce mécanisme il existe un lien fort entre l'activité de la LDN et celle de la β -oxydation. ACC2 est exprimée au niveau de la membrane mitochondriale (Abu-Elheiga et al., 2000) et contrairement à ACC1, sa délétion génique n'est pas létale mais associée à une augmentation de la β -oxydation (Abu-Elheiga et al., 2003). Il semble donc que l'ACC2 constitue un senseur mitochondrial de l'activité de la LDN. En effet, grâce à leur grande homologie, ACC1 et ACC2 ont le même mécanisme de

régulation. La présence d'ACC2 à la membrane mitochondriale pourrait éviter la mise en place d'un cycle futile entre la LDN et la β -oxydation.

(2) La cétogenèse

La cétogenèse ou synthèse des corps cétoniques est activée dès lors que l'organisme ne peut plus consommer de glucose, comme c'est le cas lors d'un jeûne prolongé ou dans le cadre du diabète. La cétogenèse se déclenche lorsque l'OAA est préférentiellement dirigé vers la voie de la néoglucogénèse ralentissant ainsi le fonctionnement du cycle de Krebs.

L'acétyl-CoA excédentaire est dirigé vers la synthèse de corps cétoniques. Dans la matrice mitochondriale deux acétyl-CoA sont condensés par la β -cétotiolase pour donner un acétoacétyl-CoA. L'HMG-CoA (Hydroxy-3 methylglutaryl coenzyme A) synthase rajoute un troisième acétyl-CoA pour former un HMG-CoA, ce composé est aussi le précurseur du cholestérol. C'est pourquoi, certaines statines sont susceptibles de diminuer la production de corps cétoniques (Sato et al., 1998).

L'HMG-CoA lyase permet la libération d'acétylacétate. La 3-hydroxybutyrate déshydrogénase permet la conversion de l'acétylacétate en β -hydroxybutyrate (β HB). La formation d'acétone se fait par décarboxylation de l'acétylacétate de façon spontanée ou médiée par l'acétylacétate décarboxylase. Ainsi, la cétogenèse permet de former trois corps cétoniques : l'acétylacétate, le β HB qui est le plus abondant et l'acétone (**Fig 9**).

L'intérêt des corps cétoniques est de convertir des acides gras en molécules solubles dans l'eau, ce qui permet une redistribution rapide de l'énergie dans l'organisme sans utiliser de protéines de transport. La cétogenèse permet également d'épargner le glucose pour les cellules qui sont exclusivement dépendantes du glucose, et de limiter la protéolyse musculaire qui a lieu pendant le jeûne.

Une fois dans les cellules cibles, comme les neurones, les corps cétoniques sont dégradés au cours de la cétolyse. La thiophorase convertit un acétoacétate en acétoacétyl-coA, qui va subir la β -oxydation, puis le cycle de Krebs et la chaîne respiratoire génèrent de l'énergie sous forme d'ATP.

La grande majorité des acides gras utilisés au cours de la cétogenèse proviennent de la lipolyse du tissu adipeux. La cétogenèse est activée par le glucagon et inhibée par l'insuline, de plus, les corps cétoniques exercent un rétrocontrôle sur leur synthèse ce qui permet d'éviter l'accumulation de ces derniers et la mise en place d'une acidocétose métabolique pouvant entraîner la mort.

La LDN et la cétogenèse sont en compétition pour la disponibilité en acétyl-CoA : ainsi la cétogenèse pourrait limiter le développement de la stéatose hépatique (Cotter et al., 2014).

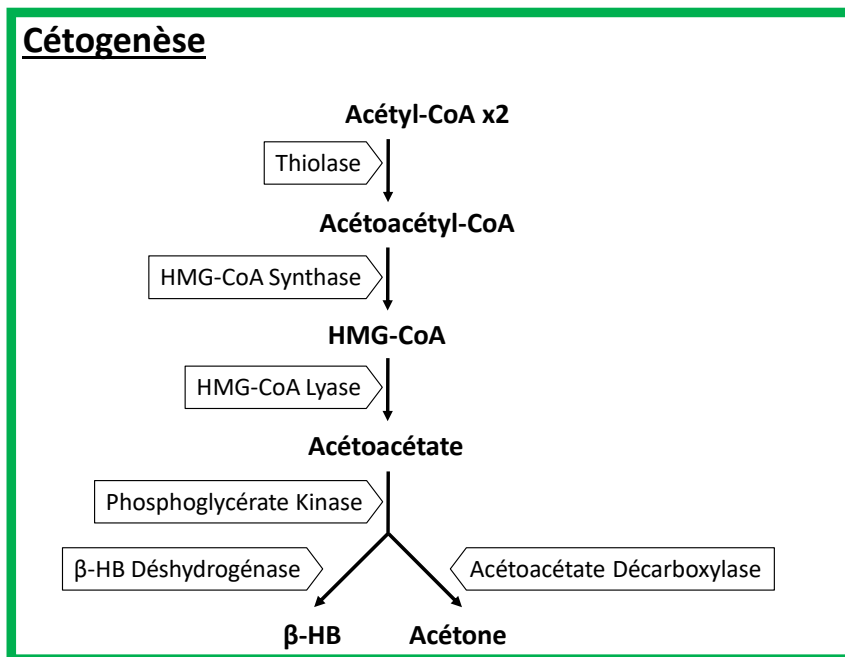


Figure 9 : La cétogenèse hépatocytaire.

Deux acétyl-CoA sont assemblés en acétoacétyl-CoA par l'action de la thiolase. La HMG-coA Synthase génère un β -hydroxy- β -méthylglutaryl-coA (HMG-coA) qui, après l'action de la HMG-coA Lyase est transformé en acétoacétate. Cet acétoacétate peut être transformé en acétone ou en β -hydroxybutyrate (β -HB), selon qu'il est décarboxylé, ou pris en charge par la β -HB déshydrogénase.

La β -oxydation est la voie essentielle pour l'adaptation du métabolisme hépatique au cours d'un régime cétogénique. Le régime cétogénique est une alimentation dont la quasi-totalité des apports énergétiques se fait sous forme de lipides. Un modèle murin déficient CPT2 spécifiquement dans les hépatocytes, donc incapable d'oxyder les lipides au niveau de la mitochondrie, voit sa capacité à produire des corps cétoniques amoindrie au cours d'un régime cétogénique. En revanche ce modèle tolère parfaitement les courtes périodes de jeûne, lorsque le glucose peut-être fourni par la glycogénolyse (Lee et al., 2016).

Tous ces résultats suggèrent une utilisation séquentielle des substrats : dans un premier temps, l'énergie nécessaire au fonctionnement de l'organisme provient de la glycogénolyse hépatique puis dans un second temps lorsque la lipolyse adipocytaire fonctionne à son maximum, les lipides sont catabolisés et les corps cétoniques formés sont exportés vers les tissus périphériques pour assurer le fonctionnement de la bêta-oxydation.

c) *La Lipogénèse De Novo hépatocytaire et synthèse de triglycérides*

La LDN permet de transformer les substrats énergétiques non lipidiques en lipides. La LDN est une voie biochimique utilisée par plusieurs organes dans notre corps, comme le tissu adipeux blanc, le foie ou les muscles squelettiques dans le but de stocker ou d'estérifier des AG toxiques en espèces inertes : les triglycérides (TG). Parmi ces tissus, le tissu adipeux est celui qui utilise principalement cette voie dans son rôle de tampon et de stockage des lipides. La LDN adipocytaire permet de stocker l'excès d'énergie sous forme de TG. Au contraire du foie, le tissu adipeux est un organe spécialisé dans le stockage des lipides. Dans le foie, les TG synthétisés vont pouvoir soit être catabolisés par l'hépatocyte soit être exportés dans le reste de l'organisme sous forme de VLDL. Les cascades biochimiques dans ces deux organes sont semblables, cependant, la LDN adipocytaire a été étudiée plus en profondeur. Cette cascade biochimique (**Fig 10**) fait intervenir de façon séquentielle six enzymes limitantes : (i) l'ATP-Citrate Lyase (ACLY), (ii) l'Acétyl-CoA Carboxylase 1 (ACC1), (iii) la fatty acid synthase, (iii) l'Elongation of very long chain fatty acids protein 6 (ELOVL6) et (iv) la stéaryl-CoA 9-désaturase (SCD1). D'un point de vue évolutif, la LDN permet de transformer un substrat énergétique abondant mais faible en énergie métabolisable (les glucides) en substrat plus riche en énergie métabolisable. En effet, l'apport énergétique des glucides est de $17\text{kJ}\cdot\text{g}^{-1}$ alors que celui des lipides est de $38\text{kJ}\cdot\text{g}^{-1}$. Bien que comparable en terme de produit, il semble que l'activation de cette voie dans le foie ou dans le tissu adipeux ait des conséquences physiopathologiques différentes. En effet, dans le foie, il semble que l'activité de la LDN soit augmentée lors de la résistance à l'insuline, cette augmentation d'activité pourrait être en partie responsable de l'installation d'une stéatose hépatique (Donnelly et al., 2005). En revanche dans le tissu adipeux, l'augmentation de l'activité de cette voie est associée à une meilleure « santé métabolique » (Scheja and Buettner, 2016). Tous ces résultats pris ensemble semblent indiquer que, contrairement au tissu adipeux, la LDN hépatique serait délétère

(i) *ATP-Citrate Lyase*

Le substrat principal de la LDN est l'acétyl-Co Enzyme A (AcétyCoA) produit lors du cycle de Krebs.

A la sortie du cycle de Krebs, le citrate est converti en Acéty-CoA par l'ATP-Citrate-Lyase (ACLY). L'ACLY est un tétramère cytoplasmique retrouvé au niveau des microsomes d'environ 440kDa dont l'ADNc a été isolé en 1984 (Sul et al., 1984) chez la souris et en 1992 chez l'Homme (Elshourbagy et al.,

1992). L'activation de l'enzyme se fait par phosphorylation médiée par la PKA ou le glucagon ou niveau de la serine 3 (Pierce et al., 1981).

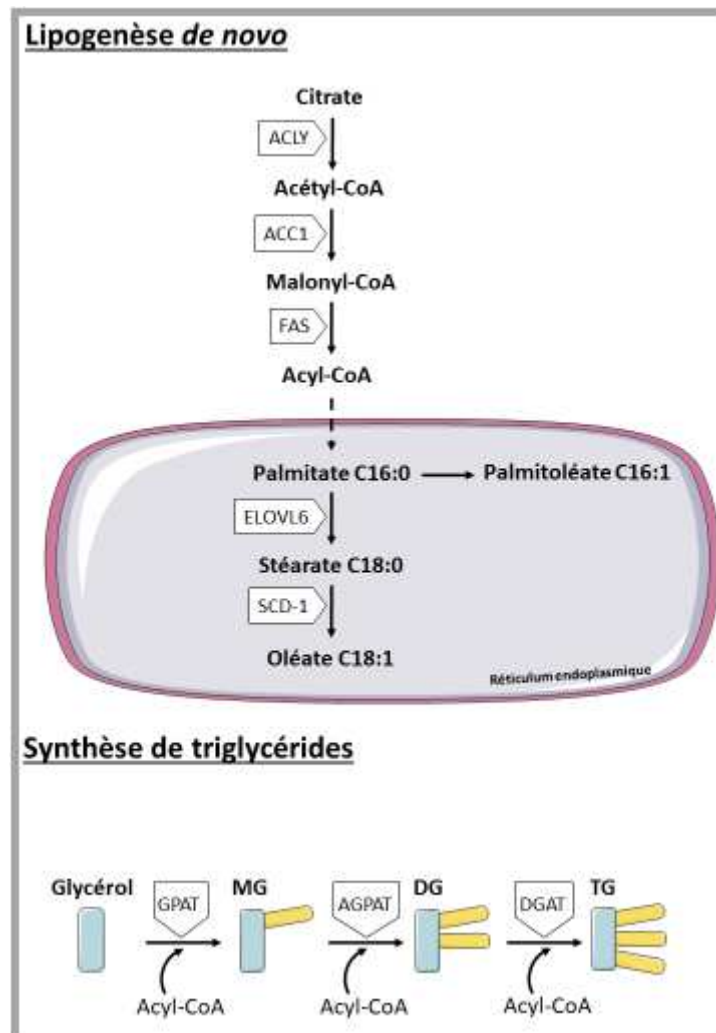


Figure 10 : La lipogenèse de novo et la synthèse de triglycérides hépatocyttaire.

Le citrate issu de la glycolyse est transformé en acétyl-coA par l'ATP-citrate lyase (ACLY), puis en malonyl-coA par l'acétyl-coA carboxylase 1 (ACC1). La Fatty Acid Synthase (FAS) crée un acyl-coA, qui subit des réactions successives de condensations décarboxylatives pour aboutir à une molécule de palmitate. Le palmitate est élongué et désaturé dans le réticulum endoplasmique, par exemple par l'Elovl6 et la SCD1. Pour former un TG, la GPAT (glycérophosphate acyltransférase) transfère un acyl-CoA sur une molécule de glycérol par estérification et génère un monoglycéride (MG). Un autre acyl-coA est ajouté par la 1-acyl-glycérol-3-phosphate acyltransférase (AGPAT) pour donner un diglycéride (DG), puis un dernier acyl-coA est ajouté par la DG-acyltransférase (DGAT) pour aboutir à un triglycéride (TG).

L'inactivation génique du gène codant pour l'ACLY dans un modèle murin entraîne la mortalité *in utero* des animaux *Acly*^{-/-} (Beigneux et al., 2004). L'inactivation de l'ACLY entraîne un effondrement des taux intra cellulaires d'acétyl- et de malonyl-CoA, essentiels pour la formation de la gaine lipidique de myéline. Cette absence de myélinisation est responsable de la mort des embryons.

Chez la souris *Db/Db* où l'activité de la LDN et l'expression de l'ACLY sont exacerbées, l'inactivation, à l'âge adulte, de l'ACLY permet en revanche de normaliser la glycémie et le contenu hépatique en triglycérides (Wang Qiong et al., 2009).

En plus de son rôle clef dans l'activité de la LDN, une étude de 2009 a montré que le traitement avec un siRNA dirigé contre l'ACLY d'une lignée de pré-adipocytes empêche sa différenciation et diminue l'acétylation des histones en réponse à un milieu riche en glucose (Wellen et al., 2009). Ces résultats suggèrent que lors de la différenciation adipocytaire, l'acétylation des histones est déterminée par la présence de glucose selon un mécanisme ACLY dépendant. Ainsi, l'ACLY permettrait de coupler la régulation épigénétique de l'expression des gènes au métabolisme cellulaire.

(i) *Acétyl-CoA Carboxylase 1*

Il existe deux isoformes de l'ACC qui ne diffèrent que dans leur partie N-Terminale. Ces protéines bien que présentant une forte homologie sont codées par deux gènes distincts. Elles catalysent la même réaction : la formation de malonyl-CoA à partir d'acétyl-CoA.

- ACC1 ou ACC α est codée par le gène *Acaca* cloné en 1995 (Abu-Elheiga et al., 1995). L'ARNm traduit est long de 330kb et comporte 64 exons. L'expression du gène est régulée par trois promoteurs (PI, PII et PIII) situés en région 5' (Mao et al., 2003; Zhao et al., 2010a) (**Fig 11**) :

- PI est un promoteur constitutif mais faiblement actif ;
- PII est le promoteur conservé dans les espèces mammifères. Il est responsable de l'immense majorité des transcrits ;
- PIII est un promoteur tissu-spécifique, majoritairement exprimé dans la glande mammaire au cours de la gestation.

Le poids moléculaire de la protéine majoritairement synthétisée est de 265kDa.

ACC1 est une enzyme cytoplasmique (Abu-Elheiga et al., 2000) exprimée dans les tissus lipogéniques (Tissu adipeux et foie) sous le contrôle des facteurs de transcription sterol regulatory element-binding protein1-c (SRBP1-c), carbohydrate-responsive element-binding protein (ChREBP) et liver X receptor alpha (Lxr α) (Zhao et al., 2010a).

La régulation de l'activité de cette enzyme se fait à plusieurs niveaux : premièrement, ACC1 est présente sous forme de dimères ayant une faible activité catalytique, puis lors de leur activation les dimères s'assemblent pour former de longs filaments (Ahmad et al., 1978).

Deuxièmement, il existe une activation allostérique de l'ACC1 par le glutamate (Boone et al., 2000) et le citrate (Vagelos et al., 1963). Comme de nombreuses enzymes, ACC1 est inhibée par son produit : le malonyl-CoA.

Le troisième niveau de régulation se fait *via* la phosphorylation inhibitrice de l'ACC sur les résidus sérine 79, 1200 et 1215 par une voie atypique AMPc-AMPK (Ha et al., 1994).

La délétion d'ACC1 dans un modèle cellulaire inhibe totalement l'activité de la LDN ce qui démontre que cette protéine est une enzyme limitante de la voie de la LDN (Ha and Kim, 1994). De façon attendue, la délétion d'ACC1 dans un modèle murin entraîne une létalité embryonnaire à un stade très précoce (entre E7.5 et E11.5) (Abu-Elheiga et al., 2005).

De même, chez l'Homme l'absence d'expression de l'ACC1 entraîne des anomalies sévères du développement cérébral et musculaire ainsi que l'absence de LDN hépatocytaire (Blom and Scholte, 1981).

En revanche, la délétion hépato-spécifique d'ACC1 prévient le développement de la stéatose sans effet sur le métabolisme glucidique (Mao et al., 2006).

Ces résultats soulignent le caractère ambivalent de la LDN : cette voie biochimique permet la constitution de stock énergétique mais aussi fournit des lipides indispensables au développement et à la maturation de l'embryon.

- ACC2 ou ACC β est codée par le gène *Acab* cloné en 1996 (HA et al., 1996). Comme pour ACC1, l'expression du gène est régulée par deux promoteurs (PI et PII) situés en région 5' (Mao et al., 2003; Zhao et al., 2010a) (**Fig 11**) :

- PI est un promoteur constitutif mais faiblement actif ;

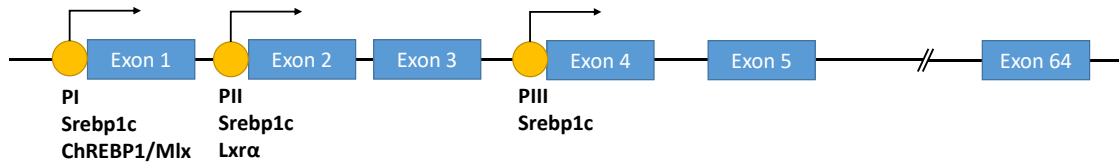
-PII est le promoteur conservé dans les espèces mammifères. Il est responsable de l'immense majorité des transcrits.

Le poids moléculaire de la protéine synthétisée est de 280kDa. ACC2 est une enzyme localisée à la membrane mitochondriale, grâce à une partie N-terminale hydrophobe, proche du transporteur CPT1a (Abu-Elheiga et al., 2000). De par sa localisation, ACC2 participe à l'inhibition de la β -oxydation en inhibant le transporteur CPT1a *via* la production de malonyl-CoA.

Dans le foie, l'expression de cette enzyme est sous le contrôle de Srebp1-c (Oh et al., 2003), ChREBP et Lxr α (Zhao et al., 2010a).

La délétion d'ACC2 dans un modèle animal augmente l'oxydation des acides gras (Abu-Elheiga, 2001) et protège contre la stéatose induite par un régime hyper lipidique (Abu-Elheiga et al., 2003).

A. ACC1



B. ACC2

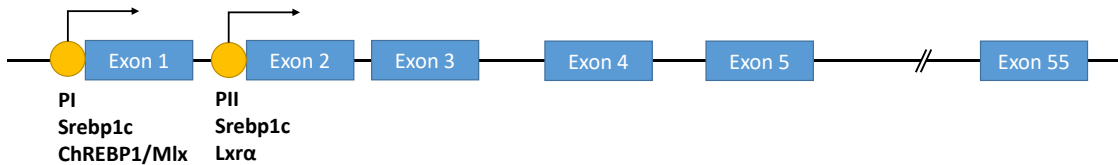


Figure 11 : Structure des gènes de l'ACC1 et de l'ACC2.

ACC1 est codé par un gène de 64 exons comportant trois promoteurs. Le promoteur I (PI) permet la transcription du gène suite à l'activation de SREBP1c et ChREBP. Le PII permet la transcription du gène suite à l'activation de SREBP1c et LXRα. Le PIII est activé suite à l'activation de SREBP1c (A). ACC2 est codé par un gène de 55 exons comportant deux promoteurs PI et PII. PI permet la transcription suite à l'activation de SREBP1c et ChREBP, PII permet la transcription suite à l'activation de SREBP1c et LXRα (B).

De façon tout à fait surprenante, la double délétion hépatique *Acaca/Acab* induit une stéatose hépatique malgré l'absence de LDN (Chow et al., 2014). Cette accumulation de lipides s'explique par la diminution de la β -oxydation.

Dans des situations où la LDN est complètement abolie par la déficience en ACC, Chow et al. rapportent que la β -oxydation est diminuée dans les foies des animaux KO. Cette diminution de la β -oxydation permet de limiter l'utilisation par le foie des lipides qui y sont stockés, ainsi ces lipides pourraient être exportés vers les tissus périphériques en cas de besoins. Dans ce contexte, l'inhibition d'ACC entraîne des mécanismes permettant de sauvegarder les stocks de lipides hépatiques.

(ii) Fatty Acid Synthase

La Fatty Acid Synthase (FAS) est une enzyme limitante de la LDN qui catalyse la formation de palmitate (C16 :0) ou d'acétate (C18 :0) à partir de malonyl-CoA. La FAS est une enzyme multifonctionnelle dont la transcription est régulée par les facteurs de transcription USF1 et 2 (Casado et al., 1999), mais aussi par les activateurs canoniques de la transcription des gènes de la LDN tels que Srebp1c (Latasa et al., 2003), ChREBP et *lxrα*.

La synthèse d'acide palmitique ou stéarique est un processus séquentiel faisant intervenir les différents domaines catalytiques. Le domaine ACP permet le transfert des différents intermédiaires de synthèse entre les différents domaines catalytiques.

Comme pour les autres déficiences en enzymes lipogéniques, la délétion du gène *Fasn* induit une létalité des embryons avant même l'implantation. Cependant les embryons *Fasn*^{+/-} peuvent connaître, dans 60 à 90% des cas, une interruption du développement.

A l'heure actuelle, il n'existe pas de modèles murins de délétion tissu-spécifique de cette enzyme. Les seules études sur l'inactivation de la FAS sont réalisées avec un inhibiteur spécifique : le C57 (Cha et al., 2004).

Chez l'Homme il existe des polymorphismes du gène *Fasn*. Parmi les 35 polymorphismes génétiques identifiés à ce jour (Schleinitz et al., 2010), la substitution Val1483Ile permettrait la protection des indiens Pimas contre l'obésité (Abu-Elheiga et al., 2005; Kovacs et al., 2004).

Les phénotypes des différents modèles KO pour les enzymes de la LDN ont en commun d'induire une létalité embryonnaire. Ce résultat suggère donc que la LDN outre son rôle dans la synthèse de substrats énergétiques joue aussi un rôle dans des processus clefs au cours du développement comme, par exemple, la myélinisation (Beigneux et al., 2004).

(iii) *Elongation et saturation*

Identifiée en 2001, la Elongation of very long chain fatty acids protein 6 (ELOVL6) catalyse la première étape d'élongation des acides gras (Moon et al., 2001) : la formation de stéarate à partir de palmitate. Dans le foie, son expression est régulée de façon synergique par SREPB1c et ChREBP (Bae et al., 2016).

Un modèle murin déficient pour *Elovl6* est protégé contre la résistance à l'insuline induite par un régime hyper lipidique, tout en présentant une stéatose exacerbée (Matsuzaka et al., 2007). De façon intéressante, les souris *Elovl6*^{-/-} présentent une stéatose hépatique importante sans insulino-résistance. L'analyse précise des espèces lipidiques présentes dans le foie révèle une diminution du ratio acide stéarique (C18 :0)/acide palmitique (C16 :0). Pris tous ensemble ces résultats soulignent l'importance des espèces lipidiques et de leurs proportions relatives sur la sensibilité à l'insuline hépatique.

Le produit final de la LDN est l'acide oléique, un acide gras saturé (C18 :1). La double liaison est synthétisée par la stéaryl-CoA 9-désaturase (SCD). SCD-1 est une enzyme ancrée dans la membrane du RE dont l'expression est régulée par Srebp1-c, Lxr α (Paton and Ntambi, 2009).

Ces acides gras à longues chaînes produits vont pouvoir soit rester dans les gouttelettes lipidiques à l'intérieur des hépatocytes, soit être exportés vers d'autres organes grâce aux VLDL. Pour cela, ces acides gras vont devoir être estérifiés sur un squelette de glycérol afin de former des triglycérides.

(iv) Estérification

La formation des TG se passe dans la face cytosolique de la membrane du réticulum endoplasmique et fait intervenir trois enzymes de façon séquentielle (**Fig 9**).

La première réaction est catalysée par la GPAT (glycérophosphate acyltransférase) qui permet l'estérification d'un acide gras sur une molécule de glycérophosphate pour former du 1-acylglycérol 3-P. Un nouvel AG est ajouté par la 1-acyl-glycérol-3-phosphate acyltransférase (AGPAT), formant un DAG. La dernière réaction conduisant à la formation d'un TG est catalysée par la DG-acyltransférase (DGAT). Ainsi, l'action de la DGAT est limitante pour la formation du pool de TG hépatique.

Il existe deux isoenzymes : DGAT1 et DGAT2. Chez l'Homme comme chez le rongeur, seule DGAT2 est exprimée dans l'hépatocyte (Yen et al., 2008). L'inhibition partielle, chez le rat, de l'expression de la DGAT2 hépatique par des oligonucléotides anti sens (ASO) diminue l'accumulation de TG d'environ 50% au cours d'un régime gras. Cette diminution de la stéatose est suffisante pour diminuer la résistance à l'insuline (Choi et al., 2007).

Au contraire, la surexpression hépatique de DGAT2 chez la souris entraîne une stéatose massive même en régime standard. Cependant, cette stéatose n'est pas associée à une altération du métabolisme glucidique (Monetti et al., 2007).

(b) Facteurs de transcription

La régulation de la cascade de la LDN est placée sous le contrôle des facteurs de transcription carbohydre responsive element binding protein (ChREBP), sterol regulatory element-binding proteins 1-c (SREBP1-c), liver X receptor (LXR), peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ), RAR-related orphan receptor gamma alpha (ROR α) et ROR γ . Ces facteurs de transcription permettent une régulation fine de l'expression des enzymes impliquées dans la voie de la LDN.

Quelle que soit leur nature, une fois activés ces récepteurs nucléaires vont recruter la même machinerie leur permettant d'activer ou de réprimer la transcription de leurs gènes cibles. Ces complexes moléculaires contiennent principalement des histones acétylases et des histones déacétylases. Toutes les protéines de ces complexes ont en commun un motif peptique particulier leur permettant d'interagir avec les récepteurs nucléaires au niveau du domaine AF-2 : LXXLL (L : Leucine, X n'importe quel acide aminé) (Heery et al., 1997).

A l'état inactif, les récepteurs nucléaires forment des complexes avec des corépresseurs, notamment, N-CoR, l'histone déacétylase HDAC3 (Heinzel et al., 1997) et SMRT (Silencing Mediator for Retinoid and Thyroid-hormone receptors) (Chen and Evans, 1995; Choi et al., 2008).

Lors de leur activation, le complexe corépresseur est remplacé par un complexe coactivateur comprenant notamment des protéines histones acetyl transferases (HAT). Le choix des protéines activatrices se fait en fonction du contexte cellulaire et des modifications post-traductionnelles des récepteurs nucléaires. Dans le cas de PPAR γ , le complexe d'activation se compose de trois groupes de protéines :

- Groupe 1 : steroid receptor co-activator 1 (p160/SCR-1) (Nolte et al., 1998) et p300/CBP (Gelman et al., 1999), ce groupe possède une activité HAT.

- Groupe 2 : ce groupe permet l'interaction entre le récepteur et la machinerie d'initiation de la transcription. Ce contact est médié notamment par PPAR binding protein (PBP/TRAP220) (Zhu et al., 1997).

- Groupe 3 : PGC1 α (PPAR γ Coactivator alpha) (Puigserver et al., 1998), Activation of androgen receptor-associated protein 7 (ADA70) (Heinlein et al., 1999) et RIP140 (Receptor-interacting protein 140) (Miyata et al., 1998).

La cinétique de recrutement des différents groupes peut se résumer ainsi : la liaison entre le récepteur et son ligand entraîne la dégradation du complexe de corépression. Le groupe 1 se constitue et permet le recrutement de la machinerie de transcription grâce à l'ouverture de la chromatine par les HAT. Le groupe 2 permet de faire le lien entre le récepteur et la machinerie de transcription et le groupe 3 permet l'activation de la transcription.

L'activité de la LDN est finement régulée par des facteurs hormonaux (l'insuline), nutritionnels (le glucose), et certains dérivés lipidiques (oxystérols, acides gras libres) et environnementaux. L'intégration des signaux environnementaux se fait *via* les rythmes circadiens.

Régulation de la LDN par le glucose : Découvert en 2001 le carbohydrate responsive binding element alpha (ChREBP α) est le facteur de transcription expliquant les effets transcriptionnels du glucose au niveau du foie (Yamashita et al., 2001).

En effet, un modèle murin présentant une délétion spécifique de *ChREBP* dans les hépatocytes présente une altération globale du métabolisme glucidique ainsi qu'une diminution drastique de l'activité de la LDN (Jois et al., 2017).

Récemment, une nouvelle isoforme de ChREBP, ChREBP β , a été identifiée dans les adipocytes. Comme ChREBP α , l'isoforme β est un régulateur global du métabolisme glucidique (Herman et al., 2012).

Pour activer la transcription de ses gènes cibles, ChREBP α forme un hétérodimère obligatoire avec max-like protein X (MLX) (Stoeckman et al., 2004). ChREBP α est un facteur de transcription de 95kDa composé de plusieurs domaines fonctionnels (**Fig 12**) : la partie N terminale de la protéine regroupe les domaines d'export (NES 1 et 2) et d'import (NLS) nucléaire ainsi que les domaines de régulation. Le domaine Low-glucose Inhibitory Domain (LID) est responsable de l'inactivation de ChREBP α lorsque la concentration de glucose intracellulaire est faible (Li et al., 2006).

L'activation de ChREBP se fait lorsque le glucose est présent en grande quantité dans la cellule, en effet, le glucose 6-Phosphate va lever l'inhibition du domaine LID et ainsi permettre la nucléarisation de ChREBP α . Il existe un autre niveau de régulation de l'activité de ChREBP, lorsque les concentrations de glucose sont faibles, ChREBP α est phosphorylé sur les résidus sérine 196 et thréonine 666 inhibant sa translocation nucléaire. Lors de l'augmentation des taux intracellulaires de glucose, la protéine phosphatase 2A (PP2A) est activée et clive le groupement phosphate sur la sérine. Une fois dans le noyau, la PP2A clive la phosphorylation de la thréonine 666, conduisant à l'activation complète de ChREBP α (Tsatsos and Towle, 2006).

Une fois activé, ChREBP α se lie aux promoteurs de ses gènes cibles. La liaison ChREBP α -Promoteurs est conditionnée par la présence de carbohydrate response element (ChoRE). Le ChoRE, qui appartient à la famille de E box, est composé de deux séquences consensus séparées par cinq bases : CAYGYGnnnnnCRCRTG (Poungvarin et al., 2015).

L'étude par chromatine immunoprécipitation couplée au séquençage (ChIP-seq) de l'interaction ChREBP α -Promoteurs montre que ChREBP α se lie principalement à des gènes impliqués dans des voies métaboliques (Poungvarin et al., 2015). On trouve notamment une interaction avec le promoteur du gène de la lipogenèse *scd1*.

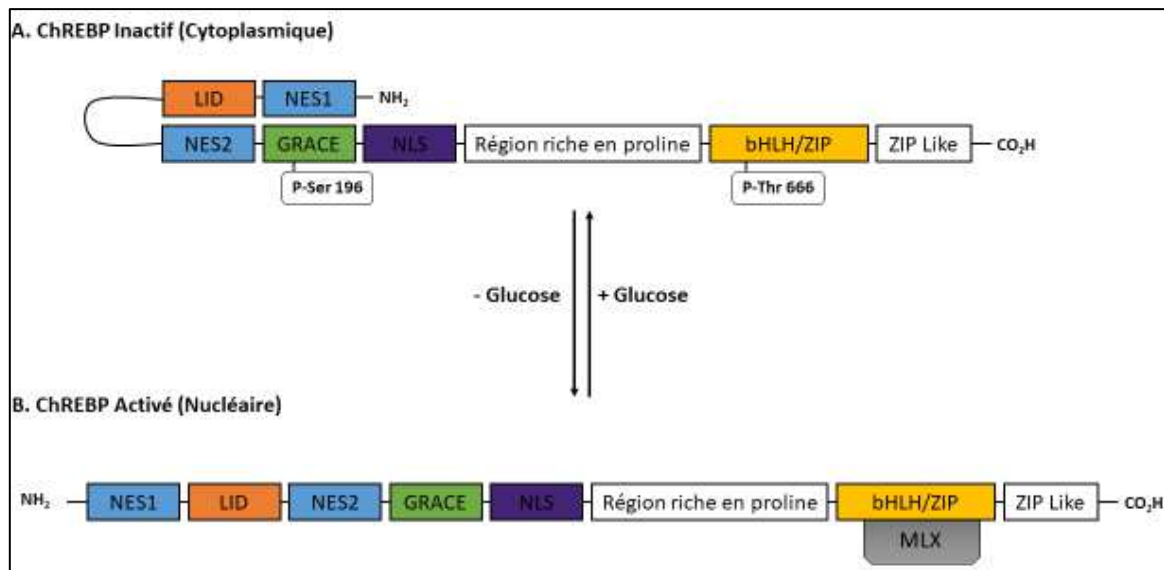


Figure 12 : Organisation générale du facteur ChREBP.

L'état inactif (A) ChREBP est cytoplasmique et la séquence de nucléarisation est rendue inaccessible par une boucle N-terminale. La liaison à l'ADN est inhibée par la phosphorylation de la thréonine 666 (P-Thr 666). En présence de glucose ChREBP (B) est activé, l'interaction avec le cofacteur max-like protein X (MLX) favorise l'interaction avec l'ADN.

Régulation de la LDN par l'insuline : Il existe trois isoformes de SREBP : SREBP1-a, SREBP1-c et SREBP2 (Sheng et al., 1995). Parmi ces différentes formes, SREBP1-c est responsable de l'expression des gènes du métabolisme alors que SREBP2 favorise la synthèse du cholestérol lorsque les niveaux intracellulaires sont bas.

La maturation de SREBP1-c est originale puisqu'elle nécessite un clivage protéolytique sous contrôle de l'insuline (**Fig 13**). La protéine immature est enchâssée dans la membrane du RE associée au sterol regulatory element-binding protein cleavage-activating protein (SCAP) et à une protéine de la famille insulin induced gene protein (INSIG). Suite à une stimulation par l'insuline, le complexe SREBP-SCAP-INSIG se dissocie et le complexe SREBP-SCAP est transporté vers l'appareil de Golgi où il sera clivé séquentiellement par deux protéases (Yellaturu et al., 2009).

Comme l'activation de SREBP1 est sous la dépendance stricte de l'insuline on peut dire que ce facteur de transcription est responsable des effets transcriptionnels de l'insuline.

Dans un contexte obésogène, la délétion de SCAP donc de SREBP dans un modèle murin, prévient le développement de la stéatose hépatique (Moon et al., 2012). Ainsi, SCAP est l'effecteur principal des effets des SREBPs.

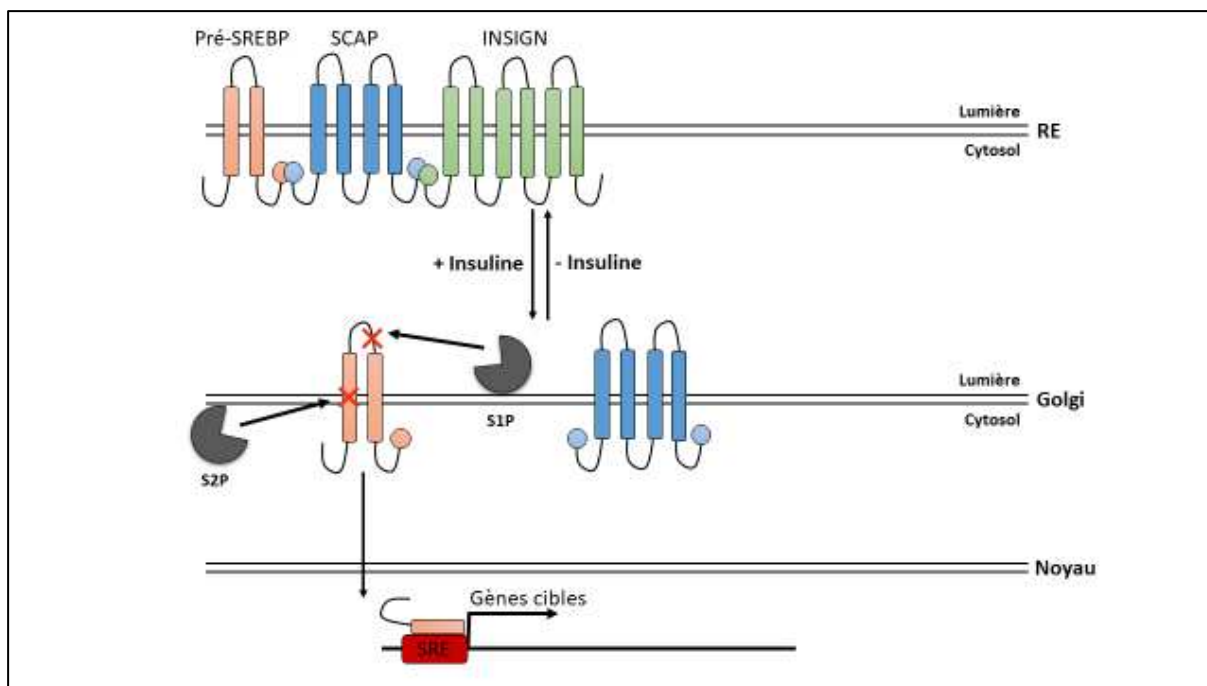


Figure 13 : Maturation de SREBP1-c.

L'insuline permet la dissociation de SCAP et de la protéine de rétention Insig-2a, ce qui induit la migration de SREBP-1c dans l'appareil de Golgi. SREBP-1c est clivé par les protéases S1P et S2P, et sa partie N-terminale entre dans le noyau, où l'expression des gènes impliqués dans la lipogenèse de novo, mais aussi dans la glycolyse, est stimulée. SCAP: SREBP Cleavage-Activating Protein, INSIG: Insulin induced gene, S1P: site 1 protease.

Les gènes cibles de SREBP1-c ont tous en commun d'avoir au niveau de leur promoteur un sterol regulatory element (SRE) de séquence : TCACnCCAC. Le recrutement de SREBP1-c au promoteur se fait en collaboration avec l'hétérodimère USF1:USF2 (Casado et al., 1999).

SREBP1-c a la particularité d'induire sa propre expression selon un mécanisme classique d'expression. Son expression est aussi sous le contrôle des facteurs de transcription LXR α et β (Repa et al., 2000).

Des données récentes de la littérature ont démontré que la voie SREBP1 permettait de diminuer l'accumulation d'acides gras libres responsables d'une lipotoxicité en les convertissant en TG (Papazyan et al., 2016) et donc de jouer un rôle protecteur.

Régulation de la LDN par les LXRs : Les liver X receptors (LXRs) (Fig 14) sont des récepteurs nucléaires d'environ 50kDa liant des dérivés oxydés du cholestérol : les oxystérols. Ces protéines se lient à des éléments de réponse particulier : les LXR Response Elements (LXRE), de séquence canonique : GGGTTTnnnnnAGTTCA. Pour activer la transcription de leurs gènes cibles, les LXRs doivent former un hétérodimère obligatoire avec le Retinoïd X Receptor (RXR).

Chez les mammifères il existe deux isoformes du LXR: LXR α et LXR β .

Cloné en 1994, LXR α est fortement exprimé dans les cellules à fort potentiel métabolique comme les hépatocytes, les adipocytes ou macrophages (Apfel et al., 1994). Cloné en 1994, LXR β est exprimé de façon ubiquitaire (Shinar et al., 1994).

Bien que codés par des gènes différents, LXR α et LXR β ont une forte homologie de séquence (77%).

Initialement, LXR α est décrit comme un régulateur clef du métabolisme du cholestérol *via* les acides biliaires. En effet, les animaux LXR α ^{-/-} soumis à un régime riche en cholestérol présentent une hépatomégalie due à une accumulation excessive de cholestérol, alors que chez les animaux sauvages, l'excès de cholestérol est éliminé dans les fèces sous forme d'acides biliaires. Ce modèle a permis d'identifier le premier gène cible de LXR α : le CYP7A1 (Cytochrome P450 7A1), enzyme limitante dans la conversion du cholestérol en acides biliaires (Peet et al., 1998).

L'effet de LXR α sur le métabolisme hépatique passe aussi par la régulation des transporteurs d'efflux du cholestérol : les transporteurs ABC (ATP-binding cassette). La déficience en LXR α empêche l'expression de ces transporteurs ce qui explique en partie l'accumulation de cholestérol dans ce modèle (Repa et al., 2002). De plus, LXR α hépatique est indispensable à l'homéostasie du cholestérol au niveau de l'organisme (Zhang et al., 2012).

Dans un modèle murin, le traitement avec un oxystérol de synthèse entraîne l'expression des gènes *Srebp1-c*, *Scd1*, *Fasn* et *Acc1* (Schultz et al., 2000).

La délétion totale de LXR α permet une résistance à l'obésité induite par un régime hyperlipidique. Ce phénotype s'explique partiellement par un défaut de LDN hépatique. En effet, il existe une action synergique entre l'induction de *Srebp1-c* et l'activité de LXR α (Kalaany et al., 2005; Repa et al., 2000; Schultz et al., 2000).

Lors d'un essai clinique avec un agoniste sélectif de LXR β , les auteurs ont mis en évidence que l'activation de ce récepteur est associée à une augmentation de la LDN hépatique associée à une neutropénie, ce qui suggère un rôle capital de cette famille de récepteur dans les l'homéostasie de ces cellules immunes (Kirchgessner et al., 2016).

L'activité transcriptionnelle de LXR α est majoritairement régulée par le statut nutritionnel. En effet, en période de jeûne, LXR α est phosphorylé par la PKA (Protéine Kinase A) sur les résidus sérine et thréonine en position 195-196 et 290-291. Cette modification inhibe l'interaction avec l'ADN en empêchant la constitution de l'hétérodimère LXR:RXR (Yamamoto et al., 2007).

A l'état inactif, le couple LXR α :RXR est associé à un corépresseur silencing mediator of retinoic acid and thyroid hormone receptor (SMRT). Lors de l'activation de la transcription, SMRT est remplacé par un coactivateur constitué d'ASC2 et p300 (Lee et al., 2001).

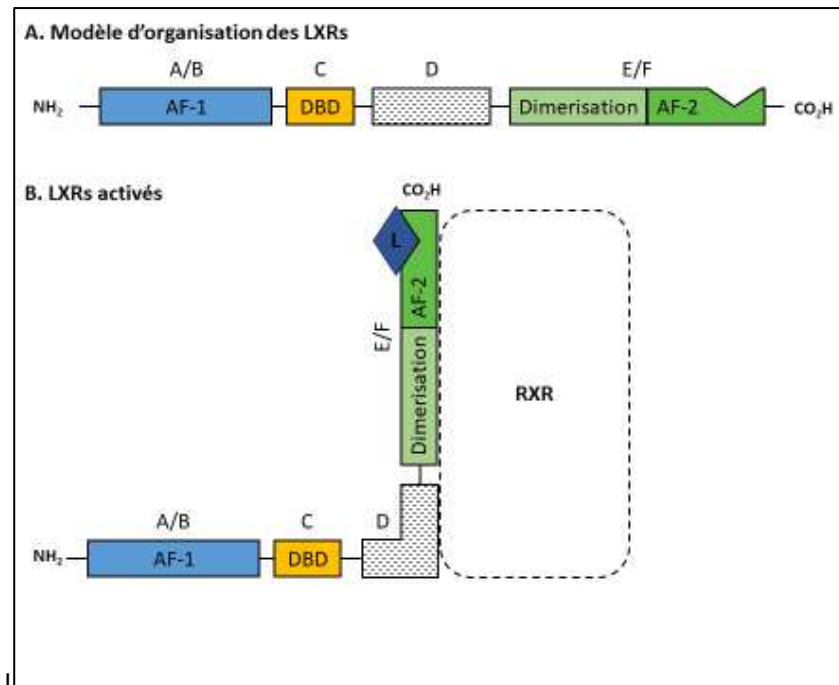


Figure 14 : Organisation générale des LXRs.

Les LXRs sont organisés en 4 domaines (A) : A/B comprenant le domaine d'activation indépendante des ligands AF-1 ; C : Domaine d'interaction avec le PPRE ; D : Domaine charnière ; E/F : Domaine de dimérisation avec RXR et d'activation dépendante du ligand AF-2. AF-1/-2 : Activation Function-1/-2 motif ; DBD : DNA Binding Domain. Lors de leur activation (B), le domaine charnière permet l'interaction avec RXR. L : ligand= oxystérol.

Régulation de la LDN par les PPARs : Les Peroxisome Proliferator-Activated Receptors (PPARs) sont une famille de récepteurs nucléaires capables de lier des lipides endogènes ou leurs dérivés comportant 3 membres : PPAR α , PPAR γ et PPAR δ . L'expression de leurs gènes cibles passe par la constitution obligatoire d'un hétérodimère PPARs:RXR (Temple et al., 2005).

Malgré leur expression et rôles différents, les PPARs ont tous la même structure et le même mode d'action. Au niveau protéique les PPARs, comme les autres récepteurs nucléaires, sont organisés en trois domaines distincts (Desvergne and Wahli, 1999) (**Fig 15**) :

- Le domaine A/B comprenant le site AF-1 (Activation Function-1 motif) permettant l'activation ligand indépendante

- Le domaine C comprenant le site de liaison à l'ADN (DBD), caractéristique de cette famille de récepteurs, contient une structure à deux doigts de zinc reconnaissant spécifiquement des éléments de réponses : les PPREs (PPAR Response Elements)

- Le domaine D permettant les changements de conformations induits par la fixation du ligand.

Le domaine E/F ou domaine de liaison aux ligands (LBD), comprenant deux sous domaines : le domaine de dimérisation avec RXR et le domaine AF-2 (Activation Function-2 motif) permettant l'activation ligand dépendante.

L'interaction entre PPAR et RXR ne dépend pas de la présence du ligand : ce complexe existe à l'état basal dans le noyau (Feige et al., 2005). La constitution de l'hétérodimère serait permise par la reconnaissance de l'ADN par RXR, plus que par la capacité des PPARs à lier le PPRE (Temple et al., 2005).

L'interaction avec l'ADN se fait au niveau de séquences conservées et spécifiques appelées PPRE (Peroxisome Proliferator Response Elements). Ces séquences sont de type Direct Repeat 1 (DR-1), soit deux séquences répétées séparées par un nucléotide : AGGTC(A)AGGTCA (Temple et al., 2005). Le dimère PPAR : RXR permet de couvrir entièrement le PPRE.

Le foie et plus particulièrement les hépatocytes expriment les trois formes de PPARs (Braissant et al., 1996).

PPAR β/δ est exprimé majoritairement dans le muscle, où il régule l'activité de la bêta-oxydation, et de façon plus faible dans le foie. Jusqu'à présent son rôle hépatique a été peu étudié. Pourtant, il semblerait que PPAR β/δ ait un rôle dans la régulation du métabolisme glucidique. En effet, l'activation de PPAR β/δ avec un agoniste spécifique, le GW0742, entraîne une diminution de l'expression de SREBP1-c et de l'activité de la LDN (Qin et al., 2008). De plus ce même agoniste est responsable de l'augmentation du stockage de glucose sous forme de glycogène au niveau hépatique (Lee et al., 2006). Récemment, l'utilisation en clinique du GFT505 (Elafibranor), un agoniste des récepteur PPAR α et PPAR β/δ a permis de diminuer la progression de la stéatose hépatique (Ratzliff et al., 2016). Enfin, la surexpression hépatique de PPAR β/δ améliore le métabolisme glucidique et la sensibilité à l'insuline reproduisant ainsi les résultats obtenus par un traitement pharmacologique (Liu et al., 2011).

Pris tous ensemble ces résultats suggèrent que le récepteur PPAR β/δ pourrait modifier l'utilisation des substrats par le foie en favorisant l'utilisation des lipides et le stockage du glucose sous forme de glycogène.

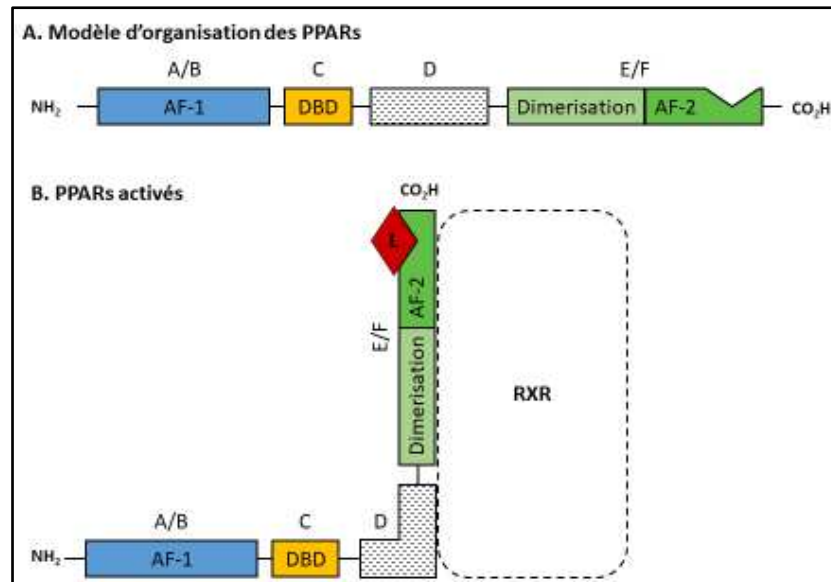


Figure 15 : Structure canonique des récepteurs PPARs.

A. Comme les autres récepteurs nucléaires, les PPARs sont organisés en 4 domaines : A/B comprenant le domaine d'activation indépendante des ligands AF-1 ; C : Domaine d'interaction avec le PPRE ; D : Domaine charnière ; E/F : Domaine de dimérisation avec RXR et d'activation dépendante du ligand AF-2. AF-1/-2 : Activation Function-1/-2 motif ; DBD : DNA Binding Domain. Le complexe PPAR γ :RXR existe déjà à l'état basal (B), la liaison du ligand de PPAR γ entraîne l'activation de la transcription des gènes cibles. L : ligand= Dérivé d'acide gras

La forme majoritaire est PPAR α (Braissant et al., 1996) dont la fonction principale est l'induction des gènes du catabolisme des acides gras (Rakhshandehroo et al., 2009), incluant des gènes impliqués dans la clairance hépatique des lipoprotéines de très faible densité (Very Low-density Lipoproteins, VLDL), le captage des acides gras et leur transport vers la mitochondrie ainsi que des enzymes de la chaîne respiratoire et de la bêta-oxydation mitochondriale et peroxysomale.

L'autre rôle prépondérant de PPAR α est lié à l'adaptation du métabolisme hépatique aux situations de jeûne notamment par la production de corps cétoniques ou cétogénèse.

Dans un modèle murin déficient pour la *Fasn* spécifiquement dans les hépatocytes, la signalisation de PPAR α au niveau du foie est abolie. Cependant, un traitement avec un agoniste spécifique de PPAR α restaure l'expression des gènes cibles de PPAR α , suggérant que le ou les ligands endogènes de PPAR α sont produits au cours de la LDN (Chakravarthy et al., 2005). En effet, un ligand endogène spécifique de PPAR α pourrait être une glycérophosphocholine dérivée de l'acide palmitique : la 16:0/18:1-GPC (Chakravarthy et al., 2009).

PPAR γ est l'acteur clef du développement et de la différenciation adipocytaire (Rosen et al., 1999). Il existe deux isoformes de ce récepteur : PPAR γ -1, ubiquitaire, et PPAR γ -2, exprimé majoritairement dans le tissu adipeux. PPAR γ -2 possède une trentaine de nucléotides supplémentaires à l'extrémité N-Terminale (Elbrecht et al., 1996).

A l'état basal, l'expression et l'activité de PPAR γ hépatique sont faibles. En revanche, lors du développement de la stéatose, son expression et son activité augmentent (Inoue et al., 2005; Pettinelli and Videla, 2011). En accord avec ces résultats, la surexpression de PPAR γ dans les hépatocytes induit le développement d'une stéatose (Schadinger, 2005). De la même façon, la délétion de PPAR γ hépatocytaire protège contre la stéatose (Matsusue et al., 2003; Moran-Salvador et al., 2011).

L'activation pharmacologique de PPAR γ par les Thiazolidinedione (TZD) a longtemps été utilisée pour traiter les cas de diabète de type 2. Chez des individus obèses et diabétiques, le traitement aux TZD permet de normaliser la glycémie et de diminuer la stéatose hépatique, cependant cet effet est foie-indépendant (Matsusue et al., 2003). En effet, les TZD permettent la prolifération du tissu adipeux ce qui permet de réorienter le flux de lipides du foie vers un organe spécialisé dans le stockage des lipides.

Régulation de la LDN par les rythmes circadiens: Les rythmes circadiens contrôlent un grand nombre de processus biologiques comme les cycles veille/sommeil, la température corporelle, la sécrétion de certaines hormones ou le métabolisme. La perturbation de ces rythmes est associée à une augmentation de la prévalence de certaines pathologies comme les cancers ou les désordres métaboliques. Le principal signal permettant la synchronisation des rythmes circadiens avec l'environnement est la lumière, détectée au niveau du système nerveux central au niveau du noyau supra-chiasmatique.

En plus d'un régulateur au niveau du système nerveux central chaque cellule possède sa propre « horloge » circadienne composée d'un hétérodimère circadian locomotor output cycles protein kaput (CLOCK) et brain and muscle ARNT-like 1 (BMAL). Le couple CLOCK:BMAL active sa propre transcription ainsi que celle des gènes *Period* circadian clock (PER) et *Cryptochrome* (CRY). Le dimère PER:CRY déstabilise le complexe de transcription CLOCK:BMAL et inhibe ainsi son activité transcriptionnelle. L'expression des récepteurs RORs et REV-ERB est régulée par les boucles PER:CRY et BMAL:CLOCK. En retour, le complexe ROR:REV-ERB active la transcription de CLOCK et inhibe celle de BMAL (**Fig 16**).

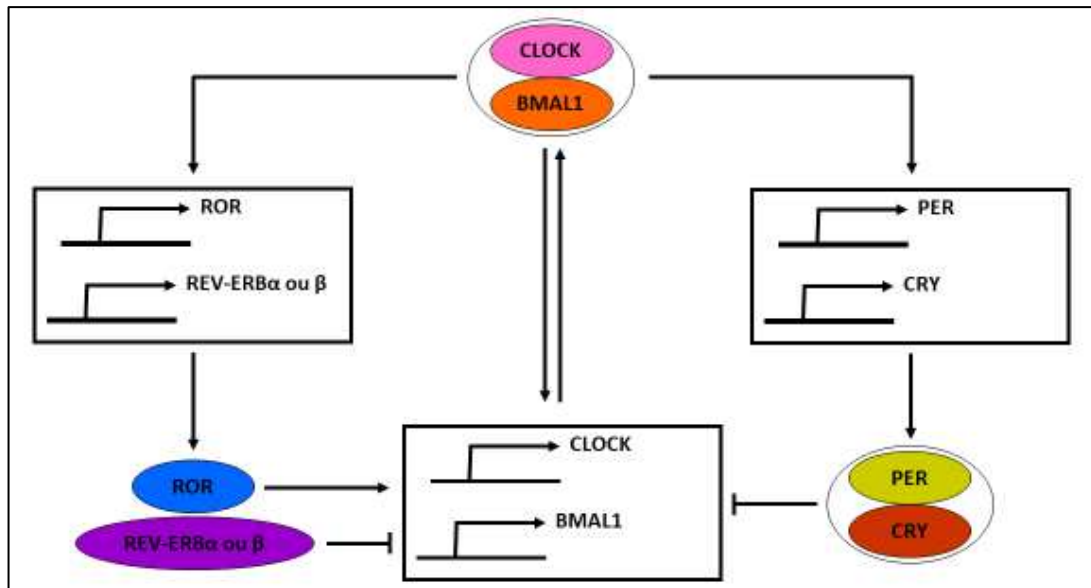


Figure 16 : Régulation des rythmes circadiens.

L'horloge circadienne est composée d'un hétérodimère CLOCK:BMAL1. Ce couple de protéines active sa propre transcription et celle des gènes PER et CRY. PER et CRY forment un dimère qui déstabilise le complexe CLOCK:BMAL1 supprimant ainsi son activité. L'expression des complexes CLOCK:BMAL1 et PER:CRY est décalée de 12 heures, permettant la mise en place d'un cycle de 24 heures. Par ce système, l'expression de ROR et REV-ERB connaît une oscillation circadienne. L'expression de CLOCK et BMAL1 est activé par ROR et inhibée par REV-ERB.

Chez les rongeurs, le jour correspond à une période d'inactivité donc de jeûne. Durant cette période, REV-ERB recrute HDAC3 et réprime l'expression des gènes de la lipogenèse. Lors de la phase nocturne, HDAC3 est libérée favorisant ainsi l'expression des gènes de la LDN (Feng et al., 2011). Ainsi, dans le foie, le contrôle circadien de l'expression des gènes de la LDN passe par HDAC3. La perturbation de ce système de régulation, soit par la délétion génique d'un des acteurs du rythme circadien soit par la délétion de HDAC, est suffisant pour induire le développement d'une stéatose hépatique (Feng et al., 2011; Kim et al., 2017; Zhang et al., 2017b). Il existe aussi une interaction directe entre ROR α et un facteur de transcription clef dans la régulation de la LDN, en effet, des données récemment publiées montrent que ROR α réprime directement l'activité de PPAR γ (Kim et al., 2017).

Pris tous ensemble, ces résultats suggèrent un lien direct et causal entre les rythmes circadiens et l'activité de la LDN.

d) *Devenir des lipides synthétisés :*

Une fois synthétisés, les lipides vont avoir deux destins différents : soit ils vont être stockés pour constituer une réserve énergétique soit ils vont être exportés vers d'autres organes.

(1) Stockage hépatique des lipides

La capacité du foie à stocker des lipides est connue depuis l'Antiquité : les Egyptiens gavaient des oies avec du grain et des figues pour produire du foie gras. D'un point de vue évolutif le stockage des lipides sous forme de TG présente un double avantage : il permet la constitution de stocks énergétiques mais aussi la protection de la cellule contre la lipotoxicité de certains lipides (Listenberger et al., 2003).

Dans le foie, le stockage des lipides se fait sous formes de gouttelettes lipidiques (GL) dans le cytoplasme des hépatocytes.

Depuis la description par Altmann et Wilson de la GL dans les années 1990, la connaissance de cette organelle est passée d'une structure inerte, une goutte d'huile dans le cytoplasme, à un système dynamique faisant intervenir de nombreux acteurs. En effet, la taille des GL est extrêmement variable : de quelques dizaines de nanomètres à plusieurs micromètres. Ces structures peuvent changer de taille en réponse à des signaux cellulaires.

Les GL sont composées d'un cœur de lipides neutres (TG et ester de cholestérol) entouré d'une membrane constituée de protéines et de phospholipides, principalement des phosphatidylcholines (PC) (Moessinger et al., 2011; Tauchi-Sato et al., 2002).

Les GL dérivent de la membrane du RE, où les enzymes responsables de la synthèse et l'estérification des acides gras sont localisées.

La formation de la GL (**Fig 17**) commence par l'accumulation entre les deux membranes du RE de di- et tri-acétyl glycérides (DAG et TG) ce qui permet la formation d'un disque. Ces lipides vont permettre le recrutement de la perilipin 3/TIP47 (Skinner et al., 2009). La présence de TIP47 (Bulankina et al., 2009) et de cavéolines-1 (Ostermeyer et al., 2004) vont permettre le bourgeonnement de la GL depuis la membrane du RE.

Une fois dans le cytoplasme, la croissance des GL est permise par deux phénomènes :

1/ Par le transfert de lipides depuis des GL préexistantes (Bostrom, 2005). Le transfert des lipides est assuré par la protéine Fat Specific Protein of 27 kDa (FSP27/CIDEA) : en se localisant au niveau de la zone de contact entre le donneur et l'accepteur, FSP27 permet le recrutement de protéines de transfert des lipides ou la formation d'un pore (Gong et al., 2011). La voie SNARE pourrait aussi être impliquée dans ces mécanismes de fusion.

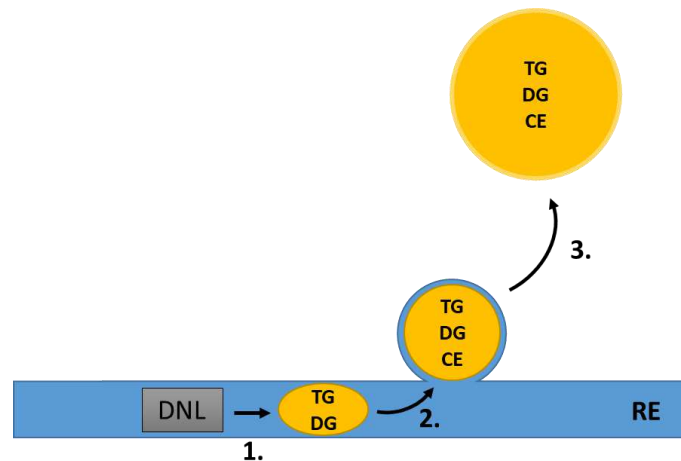


Figure 17 : Formation des gouttelettes lipidiques dans l'hépatocyte.

Les enzymes de la LDN situées dans la membrane du RE synthétisent des TG et des DG (1.). 2. Les TG et DG s'accumulent, entraînant une déformation de la membrane du RE, suite à un phénomène de bourgeonnement la LD se retrouve dans le cytoplasme et se charge en cholestéryl-esters (3.).

2/ Par la synthèse de lipides en continu. En effet, ce phénomène est rendu possible par la présence des enzymes nécessaires à l'estérification des lipides (DGAT2) (Stone et al., 2009) et des enzymes de synthèse des PC indispensables à la constitution de la membrane de la GL (Moessinger et al., 2011).

(2) Dégradation des TG hépatiques

Les triglycérides contenus dans les GL vont pouvoir être catabolisés par l'action séquentielle de différentes enzymes, notamment PNPLA3 (Patatin Like Phospholipase Domain Containing 3) ou l'ATGL (Adipose Triglycerides Lipase) qui participent à l'hydrolyse des TG, permettant la libération d'acides gras libres pouvant être dégradés par la β -oxydation mitochondriale. Contrairement à la lipolyse adipocytaire qui est un mécanisme bien connu, la lipolyse dans les tissus périphériques, comme le foie, reste encore à décrire.

Les GL peuvent aussi être catabolisées par des mécanismes autophagiques aussi appelés macrolipophagie, en effet, dans le foie l'inactivation de ces voies entraîne l'apparition d'une stéatose. Cette voie de dégradation des lipides pourrait permettre de fournir les acides gras nécessaires à la constitution des lipoprotéines de très faible densité (VLDL) (Singh et al., 2009).

e) Export dans les VLDL

L'export des lipides par le foie est permis par la constitution de lipoprotéines particulières : les VLDL. Ces lipoprotéines sont majoritairement constituées de TG (55%), mais aussi de cholestérol, d'ester de cholestérol et de phospholipides. Ainsi, ces vésicules permettent de transporter des substrats énergétiques (TG) mais aussi des lipides permettant de structurer les membranes plasmiques (cholestérol, esters de cholestérol et phospholipides). Les VLDL se distinguent des autres lipoprotéines par la présence à leur surface d'une apolipoprotéine (Apo) particulière : l'ApoB100.

Chez l'homme, certains cas d'hypobétalipoprotéinémies familiales sont associés à des mutations permettant la synthèse de formes tronquées de l'ApoB (Schonfeld, 2003). Cette pathologie est notamment associée à une stéatose hépatique.

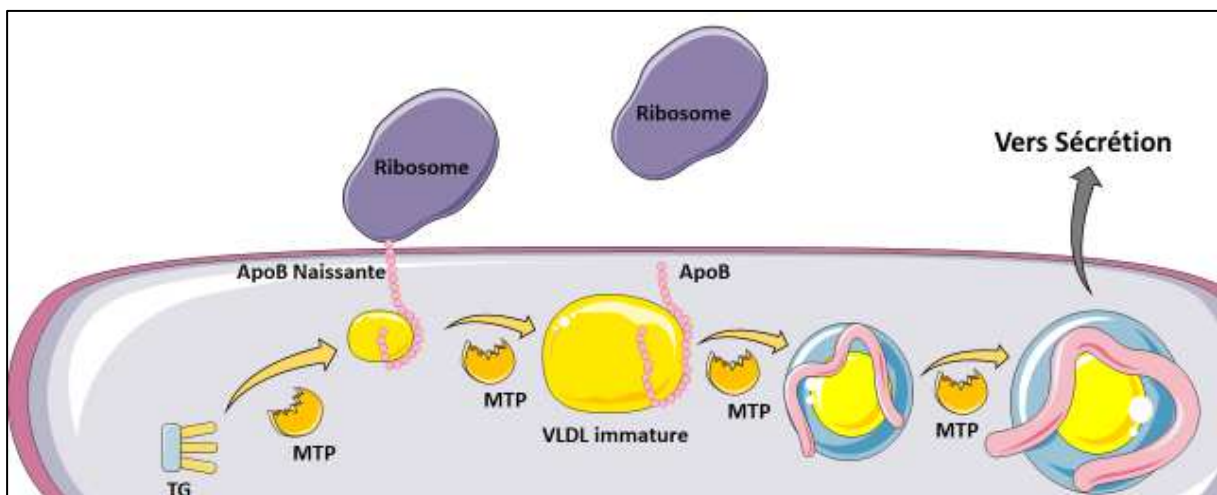


Figure 18 : Constitution et sécrétion des VLDL par l'hépatocyte.

L'apolipoprotéine B100, au cours de son élongation dans le réticulum endoplasmique, est prise en charge par la chaperonne MTP (microsomal TG transfer protein), et mise en contact avec les lipides, formant une VLDL qui sera sécrétée dans les sinusoides.

La synthèse de l'ApoB100 dans le réticulum endoplasmique constitue la première étape de la formation des VLDL. Au cours de la synthèse de cette protéine de 4 536 aa, extrêmement hydrophobe, la partie N-ter interagit avec la protéine chaperonne MTTP (microsomal TG transfert protein) pour former une poche de liaison des lipides (Dashti et al., 2002), cette première étape permet la formation de VLDL naissantes. La MTTP permet la croissance en taille des VLDL par incorporation de TG. Les VLDL sont ensuite transférées vers le Golgi pour rejoindre la voie de sécrétion.

La formation et la sécrétion des VLDL dépendent de plusieurs facteurs et notamment de la disponibilité en acides gras soit d'origine alimentaire (Zhang et al., 2004) soit provenant de la lipolyse hépatique (Singh et al., 2009).

La sécrétion des VLDL est aussi affectée par le statut nutritionnel, en effet, l'insuline inhibe la transcription de la MTP *via* un mécanisme FOXO1-dépendant (Kamagate et al., 2008).

Lors de la progression de l'obésité, la capacité de sécrétion des VLDL est augmentée (Mittendorfer et al., 2016). Dans ce contexte il semblerait que la sécrétion augmentée de VLDL soit un mécanisme compensatoire pour éviter le développement d'une stéatose hépatique. Au contraire, les individus souffrants d'une hypobétalipoprotéïnémie (*i.e.* une déficience en ApoB) sont plus à même de développer une stéatose hépatique. Pris tous ensemble ces résultats suggèrent que l'export des VLDL pourrait être un moyen de régulation du contenu en TG hépatique.

C. Stéatose, un premier pas vers le cancer

1. Contexte physiopathologique

La stéatose se développe principalement sur un terrain associant obésité et syndrome métabolique (SMe).

L'obésité est définie par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) comme une accumulation anormale ou excessive de graisse pouvant nuire à la santé. Cliniquement cette pathologie se définit par un indice de masse corporelle (IMC) supérieur à 30kg/m².

Le SMe désigne l'association d'une série de symptômes incluant :

- Une obésité abdominale,
- Une résistance à l'insuline,
- Une intolérance au glucose,
- Des dyslipidémies,
- De l'hypertension.

L'OMS et le National Cholesterol Education Program (NCEP ATPIII) ont émis une série de critères permettant de poser le diagnostic de SMe (**tableau 2**).

Selon les critères de l'OMS, le diagnostic est positif si le patient présente une perturbation du métabolisme glucidique et/ou une résistance à l'insuline associée à au moins deux autres critères.

Selon les critères de traitement des adultes du Programme national d'éducation sur le cholestérol (NCEP ATPIII), le diagnostic est positif si au moins trois critères sont retrouvés.

La survenue du syndrome métabolique est associée à un risque accru de développer des maladies cardio-vasculaires, un diabète de type 2 ou encore des pathologies circulatoires. De plus, les personnes souffrant du SMe seraient plus susceptibles de souffrir de dépression ou d'anxiété ou de développer un déclin cognitif précoce.

La prévalence du SMe est en pleine augmentation dans le monde avec de nombreuses variations dues au genre, à l'ethnicité, à l'âge ou aux critères de diagnostic utilisés. A titre d'exemple, en Corée du Sud la prévalence du SMe, basée sur le NCEP ATPIII, est de 5,2% pour les hommes et 9,05% pour les femmes alors qu'aux Etats-Unis, la prévalence est de 33,7% pour les hommes et 35,4% pour les femmes.

Trait clinique	Critère de l'OMS	Critères NCEP ATP III
Perturbation du métabolisme glucidique/ Résistance à l'insuline	T2M <i>ou</i> Glycémie à jeun >110mg/dL <i>ou</i> tolérance au glucose diminuée <i>ou</i> capture du glucose sous le plus bas quartile lors d'un clamp hyperinsulinémique-euglycémique	Glycémie à jeun >110mg/dL
Obésité abdominale	Rapport taille/hanche >0,90 (♂), >0,85 (♀) <i>ou</i> IMC >30kg/m ²	Circonférence de la taille >102cm (♂), 88cm (♀)
Hypertriglycémie	>150mg/dL	>1,5g/L
Faible taux de HDL Cholestérol	<35mg/dL (♂), <39mg/dL (♀)	<40mg/dL (♂), 50mg/dL (♀)
Pression artérielle élevée	>140-90mmHg	>130-90mmHg
Microalbuminurie	>20µg/min <i>ou</i> ratio albumine/créatinine >30	n.a.

Tableau 2 : Critères de diagnostic du SMe selon l'OMS et le National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III (NCEP ATP III).

D'après Moller et Kaufman (Moller and Kaufman, 2005).

2. Epidémiologie et Cascade pathologique

La stéatose ou NAFLD (Nonalcoholic fatty liver disease) est reconnue comme la manifestation hépatique du syndrome métabolique (Marchesini et al., 2001). Cette affection touche aujourd'hui 25% des adultes dans le monde (**tableau 3**). Le NAFLD est cliniquement défini par une accumulation de lipides dans plus de 5% des hépatocytes, en l'absence d'autres affections hépatiques telles que les hépatites chroniques, la prise de médicaments stéatogènes comme l'Amiodarone ou le tamoxifène, d'autres pathologies hépatiques (hémochromatose, maladie de Wilson) ou la consommation excessive d'alcool (> à 2 verres/jour pour les femmes et > 3 verres/jour pour les hommes) (Brunt et al., 1999).

Le NAFLD est une cascade pathologique allant de la stéatose souvent asymptomatique pouvant évoluer vers un stade symptomatique appelé stéatohépatite ou NASH (nonalcoholic steatohepatitis). Ce stade associe la stéatose à une inflammation et des processus cicatriciels pouvant déboucher sur une fibrose hépatique. Lorsque la fibrose est établie, la NASH peut évoluer vers le

développement d'une cirrhose voir d'un carcinome hépatocellulaire (CHC). Alors que les stades NAFLD et NASH sont réversibles, le stade de cirrhose est irréversible et risque d'entraîner la mort du patient. En plus des conséquences sur la santé des patients, la stéatose et les stades plus avancés représentent un coût sociétal considérable estimé à 5 460 euros par patient/an (Younossi et al., 2016a).

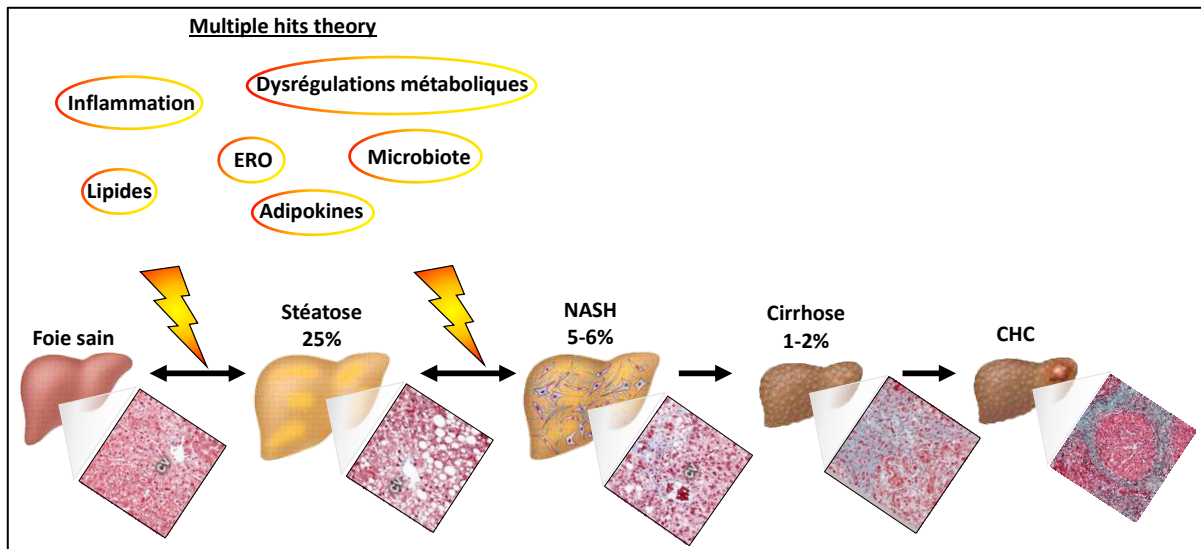


Figure 19 : La stéatose, une porte d'entrée vers le cancer du foie.

La stéatose est une affection qui concerne 25% de la population adulte aux États-Unis. Parmi tous ces patients, 5 à 6% vont développer une stéatohépatite non alcoolique (NASH). Le développement d'une stéatose et la progression vers la NASH sont sous la dépendance de plusieurs hits (Multiple hit theory) comme l'inflammation, les dysrégulations métaboliques, certains lipides, les ERO, des facteurs dérivés du microbiote ou du tissu adipeux. Une faible proportion (1 à 2%) des patients atteints de NASH vont développer une cirrhose et sont à risque de développer un cancer du foie (CHC). (D'après (Cohen et al., 2011; Diehl and Day, 2017)).

La méta-analyse de Younossi *et al.* (Younossi et al., 2016b) portant sur 8 millions de patients dans 22 pays rapporte que la prévalence de la NAFLD atteint 25,4% de la population mondiale avec cependant, de grandes disparité entre les continents, tant en terme de prévalence qu'en nombres d'études disponibles (**Tableau 3**). La prévalence de cette pathologie est en constante augmentation, elle est passée de 15% en 2005 à 25% en 2010. Il faut noter que l'augmentation de cette prévalence est comparable à celle de l'augmentation de l'obésité.

Continent	Nombre d'études disponibles (n=)	Prévalence (%)
Afrique	2 (250)	13,48
Asie	14 (265 510)	27,37
Europe	11 (230 685)	23,71
Moyen-Orient	3 (1 592)	31,79
Amérique du Nord	13 (8 016 928)	24,13
Amérique du Sud	2 (424)	30,45
Total	45 (8 515 389)	25,24

Tableau 3 : Nombre d'études et prévalence de la NALFD.

D'après Younossi et al. (Younossi et al., 2016b).

Chez des patients stéatotiques mais non obèses et non diabétiques, il existe une insulino-résistance systémique (Bugianesi et al., 2005). Dans le cas de patients obèses et diabétiques, la quantité de TG intra-hépatiques (TGIH) est directement corrélée à la diminution de la sensibilité à l'insuline du foie, des muscles et du tissu adipeux (Korenblat et al., 2008) et ce, de façon indépendante de la quantité de tissu adipeux viscéral (Fabbrini et al., 2009).

Pris tous ensemble, ces résultats suggèrent que, chez l'Homme, l'accumulation de triglycérides dans le foie est responsable et suffisante pour induire une résistance à l'insuline systémique entraînant des perturbations dans l'homéostasie énergétique.

La résistance à l'insuline est la situation pathologique pour laquelle on observe un défaut de l'action de l'insuline au niveau des tissus cibles : principalement le foie, le tissu adipeux et les muscles. La résistance à l'insuline se manifeste par une augmentation de la production hépatique de glucose *via* la voie de la néoglucogenèse, ainsi que la diminution de la captation du glucose par le tissu adipeux et les muscles. Toutes ces altérations sont responsables de l'augmentation de la glycémie. En conditions physiologiques, l'insuline est une hormone anti-lipolytique (Chakrabarti et al., 2013). Lors du développement du syndrome métabolique et de la résistance à l'insuline ce frein est levé, entraînant une lipolyse exacerbée en partie responsable de l'augmentation des concentrations plasmatiques d'acides gras libres.

Dans un foie sain, l'insuline inhibe la production hépatique de glucose (PHG) et favorise la synthèse des triglycérides par la voie de la LDN. Lors de SMe, il existe une résistance à l'insuline « sélective » hépatique : l'insuline n'inhibe plus la PHG mais continue de favoriser le stockage de lipides (Brown and Goldstein, 2008). Cet effet paradoxal est dû au fait que les substrats responsables de la PHG proviennent de la lipolyse du TA, principalement sous forme de glycérol (Titchenell et al., 2016).

3. Etiologie

Le développement du NAFLD est dû à un excès d'acides gras arrivants ou produits par le foie. Il existe des sources exogènes (alimentation) et des sources endogènes (lipolyse du tissu adipeux et LDN) d'acides gras.

a) Sources d'acides gras

Il existe trois sources d'acides gras pouvant entraîner le développement et la progression de la stéatose (**Fig 19**).

1/ Les acides gras alimentaires : De façon contre-intuitive, les acides gras d'origine alimentaire, ne sont responsables que de 15% (Donnelly et al., 2005) des lipides intra-hépatiques. Ces lipides d'origine alimentaire sont majoritairement stockés sous forme de TG intracellulaires pour être ensuite exportés au cours des phases de jeûne.

2/ Les acides gras libres : Les acides gras libres proviennent majoritairement de la lipolyse du tissu adipeux. La lipolyse du tissu adipeux permet, à partir de glycérol, la libération de trois acides gras et d'un glycérol. La libération des produits se fait par des hydrolyses enzymatiques successives : le TG est converti en DAG par l'adipose triglycerides lipase (ATGL). La lipase hormono-sensible (LHS) clive un autre acide gras pour donner un monoglycéride (MG). Finalement, le MG est clivé par la monoglycéride-lipase (MGL) pour donner un acide gras et du glycérol.

Hors période post-prandiale, la majorité (82%) des acides gras libres circulants proviennent de la lipolyse du tissu adipeux (Donnelly et al., 2005).

Les acides gras issus de la lipolyse du tissu adipeux sont majoritaires dans la constitution des stocks de TG IH : 59% des lipides retrouvés dans les TG IH proviennent de la lipolyse du tissu adipeux.

3/ La LDN hépatocytaire : Dans un contexte de résistance à l'insuline, le rétrocontrôle négatif normalement exercé par cette dernière sur l'activité de la LDN hépatique est perdu. Dans ce contexte, la LDN fonctionne à plein régime et fournit 26% des acides gras estérifiés en TG (Donnelly et al., 2005).

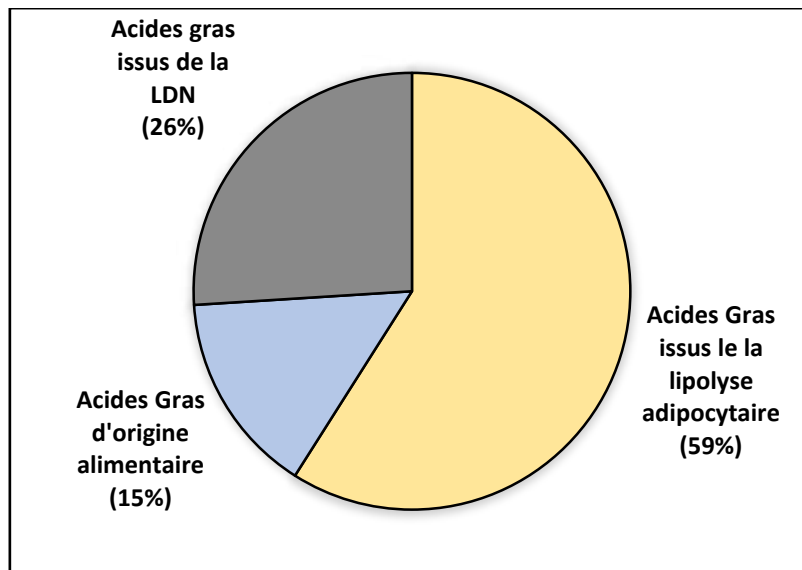


Figure 20 : Contribution relative des différentes sources d'acides gras au cours du développement de la stéatose.
 Au cours de la progression de la stéatose, les acides gras libres arrivant au foie sont estérifiés en TG. La source majeure de ces acides gras libres est la lipolyse adipocytaire (59%) suivi par la LDN hépatique (26%), les lipides provenant de l'alimentation ont une contribution limitée (15%). D'après (Donnelly et al., 2005).

Chez un individu sain, l'absorption aigüe d'acides gras, sous forme d'huile de palme, est responsable d'une diminution globale et hépatique de la sensibilité à l'insuline, de 25% et 15% respectivement, ainsi que du développement d'une stéatose modérée. De plus, l'analyse du transcriptome hépatique de souris ayant reçu le même traitement montre l'activation des voies de transcription PPAR γ -dépendantes ainsi que des voies canoniques de l'inflammation (Hernández et al., 2017). Pris tous ensemble ces résultats suggèrent que l'excès de lipides alimentaires constitue le point d'entrée de cette cascade pathologique.

b) Mécanismes mis en jeux

L'accumulation de lipides dans le foie s'avère toxique pour les hépatocytes. Au cours de la progression de cette cascade pathologique, il existe une modification aussi bien quantitative que qualitative des espèces lipidiques retrouvées au niveau hépatique (**tableau 4**) (Puri et al., 2007). L'accumulation des différentes espèces lipidiques participe à la mise en place d'un phénomène appelé la lipotoxicité. La lipotoxicité se développe lorsque les systèmes de lutte contre l'accumulation de lipides sont dépassés conduisant à un fonctionnement anarchique de ces derniers. Ces altérations du métabolisme hépatique sont responsables de l'accumulation d'espèces moléculaires toxiques pour l'hépatocyte.

La lipotoxicité est principalement due aux acides gras libres saturés, ces espèces forment des lysophosphatidylcholine (LPC) capables d'induire l'apoptose des hépatocytes en provoquant des dysfonctions mitochondriales (Kakisaka et al., 2011).

Les acides gras saturés néfastes sont convertis par la SCD1 en acides gras mono-insaturés (AGMI) considérés comme protecteurs contre la lipotoxicité. Dans ce contexte, la SCD1 joue un rôle clef dans le développement des atteintes hépatiques rencontrées lors de la progression du NAFLD vers la NASH (Li et al., 2009).

Lipides (nmol/g ± SEM)	Contrôle (n=9)	NAFLD (n=9)	NASH (n=9)
Totaux	16 000 ± 1 100	50 000 ± 1 100	44 000 ± 6 000
Mono insaturés	4 000 ± 258	20 000 ± 5 000	15 000 ± 2 000
Poly insaturés	5 000 ± 347	7 000 ± 606	10 000 ± 1 000
Acides gras libres	6 000 ± 1 000	6 000 ± 1 000	6 000 ± 584
DG/TG	7	26	31
Cholestérol libre	8 000 ± 718	10 000 ± 1 000	13 000 ± 1 000
LPC	2 000 ± 308	2 000 ± 505	2 000 ± 475

Tableau 4 : Classes de lipides au cours de la progression de la stéatose.

D'après Puri et al. (Puri et al., 2007).

Au cours de la progression du NAFLD la synthèse de cholestérol est augmentée, ce qui conduit à l'accumulation de cholestérol libre dans les hépatocytes (Min et al., 2012). Le cholestérol accumulé dans les mitochondries sensibilise les hépatocytes au stress oxydant en diminuant les systèmes de lutte contre les radicaux libres (Marí et al., 2006). Le cholestérol libre est aussi responsable de l'apoptose induite par la voie JNK, et permet aussi la mise en place d'une cascade inflammatoire dépendante de la protéine HMGB1 (Gan et al., 2014).

Afin de limiter la quantité d'acides gras libres dans la cellule, la synthèse de TG est augmentée, conduisant à une accumulation de cette espèce lipidique au sein de l'hépatocyte. L'accumulation des TG a longtemps été considérée comme le « premier hit » permettant le développement du NAFLD (Day and James, 1998). Cependant, une étude publiée en 2007 démontre que l'accumulation de TG est insuffisante pour entraîner une résistance à l'insuline. La surexpression de la dernière enzyme impliquée dans la synthèse des TG, la DGAT entraîne une accumulation de TG sans affecter la sensibilité à l'insuline systémique (Monetti et al., 2007). L'inhibition de DGAT2 diminue la stéatose hépatique

mais augmente les lésions hépatiques lors de la progression du NFLD vers la NASH (Yamaguchi et al., 2007).

Ces résultats suggèrent que les TG constituent à la fois une forme de stockages des acides gras mais aussi un moyen de prévenir la lipotoxicité. En effet, la synthèse de TG permet de rendre inactif des dérivés lipidiques toxiques pour la cellule (Listenberger et al., 2003).

L'augmentation de la synthèse de TG peut être bénéfique d'un côté, mais peut aussi être un facteur responsable de l'IR hépatique puisqu'il a été montré que l'accumulation d'intermédiaires de synthèse des acides gras tels que les DAG pouvait favoriser le recrutement de la protéine kinase ϵ (PKC ϵ). La PKC ϵ favorise l'apparition de la résistance à l'insuline hépatique en phosphorylant le récepteur à l'insuline sur le résidu thréonine en position 1160 (Petersen et al., 2016).

Les lipides vont aussi augmenter l'activité des voies de leur catabolisme. En effet, un défaut des capacités oxydatives des mitochondries favorise la progression de la stéatose. En effet, il existe une flexibilité métabolique mitochondriale : lors de la progression de l'obésité, la capacité respiratoire des mitochondries est augmentée chez les patients. En revanche, l'augmentation des capacités respiratoires est perdue au cours de l'augmentation des lésions hépatiques. La pleine activité des mitochondries peut être génératrice d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) (Koliaki et al., 2015). Les ERO sont responsables de dommages oxydatifs de l'ADN pouvant entraîner la mort des hépatocytes et ainsi favoriser la progression du NAFLD vers la NASH.

La persistance des agressions hépatiques dues à l'accumulation de lipides, les signaux pro inflammatoires générés par la nécrose primaire ou secondaire des hépatocytes, la résistance à l'insuline ou l'excès de lipides libres circulants favorisent le développement d'un stade symptomatique : la stéatohépatite ou NASH (nonalcoholic steatohepatitis).

En 1998, un modèle d'évolution de la stéatose vers la NASH est proposé par Christopher Day et Oliver James, le modèle des deux « *hits* ». Dans leur modèle la progression dans cette cascade se fait de façon séquentielle : le premier *hit* induit une stéatose puis le second *hit* favorise le développement d'une source de stress oxydant capable d'initier la peroxydation des lipides. La combinaison de ces deux hits favorise la progression vers la NASH (Day and James, 1998).

Dans les années 2010, un nouveau modèle a été proposé faisant intervenir de multiples *hits* en parallèle (Buzzetti et al., 2016). Parmi ces *hits* on retrouve des signaux propres au foie comme l'inflammation, la dysrégulation du métabolisme lipidique, la production d'ERO par les mitochondries ou une altération du métabolisme des acides biliaires, mais aussi des signaux provenant des organes

périphériques comme des adipokines ou des molécules pro-inflammatoires provenant de l'intestin et du microbiote (**Fig 19**).

Tous ces hits contribuent à l'entretien des mécanismes fibro-inflammatoires responsables de l'installation de la NASH.

D. NASH

1. Prévalence

La NASH est très fortement associée à l'obésité et au SMe. Une étude récente démontre que 80% des patients atteints de NASH sont obèses ou en surpoids, 72% présentent une dyslipidémie et 44% sont diabétiques de type 2 (Younossi et al., 2016b).

Malgré la forte prévalence du NAFLD, la progression vers la NASH concerne un faible nombre de cas en effet, 25% des patients NAFLD vont développer une NASH. Les mécanismes gouvernant la transition NAFLD/NASH sont encore méconnus. Cependant, il est communément admis que la persistance et l'aggravation des mécanismes fibro-inflammatoires favorisent cette transformation.

Bien que d'étiologie différente les stéatohépatite induites par l'alcool, les médicaments ou l'obésité présentent les mêmes caractéristiques.

2. Caractéristiques

D'un point de vue histologique, la NASH se définit par la présence de structures caractéristiques de phénomènes nécro-inflammatoires tels que :

- une stéatose macro vésiculaire,
- un gonflement ou « ballooning » des hépatocytes,
- une inflammation lobulaire,
- une inflammation portale,
- la présence de corps de Mallory.

La présence de ces altérations ainsi que leur fréquence permet de définir un score appelé NASH activity score (NAS, **tableau 5**). Ce score permet de déterminer la sévérité des atteintes et de poser un

diagnostic de NASH. Si le NAS est inférieur à 3, le diagnostic de NASH est négatif, en revanche, si le NAS est supérieur à 5 le diagnostic de NASH est probable (Kleiner et al., 2005).

Caractéristique anatomo-pathologique	Evaluation	Score
Balooning des hépatocytes	Aucun	0
	Peu	1
	Beaucoup	2
Inflammation lobulaire	Aucune	0
	<2 foyers par champ 200x	1
	2-4 foyers par champ 200x	2
	>4 foyers par champs 200x	3
Stéatose	< 5% des cellules	0
	5% - 33%	1
	>33% - 66%	2
	>66%	3

Tableau 5 : Le NAFLD activity score.

Le NAS se calcule en prenant en compte des critères histologiques observés sur une biopsie hépatique. Selon la sévérité chaque critère se voit attribuer un score allant de 1 à 3, la somme de ces différents scores permet de déterminer la sévérité des atteintes hépatiques. NAS<3 : pas de NASH, NAS>5 : NASH probable.

3. Traitements

A l'horizon 2020, la NASH sera la première cause de transplantation hépatique devant les greffes imputées à l'alcool ou aux hépatites chroniques. Le coût élevé de cette intervention, 650 000 euros en moyenne, le risque de complications graves et le faible nombre de donneurs poussent l'industrie pharmaceutique à développer de nouvelles approches thérapeutiques pour lutter contre la progression de cette pathologie. Actuellement, une cinquantaine de molécules sont en cours d'essais cliniques dans le cadre de la NASH. L'analyse de différentes voies métaboliques ciblées permet de dégager quatre groupes majoritaires (**Tableau 6**) :

- Groupe 1 (33%, orange) : molécules ciblant le métabolisme lipidique dont le chef de file est l'Elafibranor

- Groupe 2 (24%, rouge) : molécules ciblant les processus inflammatoires dont le chef de file est le Selnosertib

- Groupe 3 (17%, vert) : molécules ciblant le métabolisme des acides biliaires dont le chef de file est l'Ocaliva

- Groupe 4 (26%, blanc) : molécules ciblant d'autres voies métaboliques.

Nom	Cible	Mode d'action	Phase Clinique
Elafibranor (GFT505)	Lipides	Double agoniste PPAR α / Δ	3
GS0976	Lipides	Inhibiteur de l'ACC	2b
Aramchol	Lipides	Inhibition partielle de SCD1 et activation de l'efflux de cholestérol)	2b
MSDC_0602	Lipides	PPAR γ (analogue de la pioglitazone)	2b
Seladepar (MBX_8025)	Lipides	Agoniste PPAR Δ	2b
Saroglitazar	Lipides	Double agoniste PPAR α / γ	2b
Icosutate	Lipides	Inhibiteur de la synthèse de TG	2b
BMS986036	Lipides	Mimétique FGF21 (PEG-FGF21)	2b
Lanfibranor (IVA337)	Lipides	Tri agoniste PPAR α Δ γ	2b
PF_05221304	Lipides	Inhibiteur de l'ACC	2a
Gemcabene	Lipides	Favorise la clearance des VLDL, potentiel inhibiteur de l'ACC	2a
PF_06865571	Lipides	Inhibiteur de DGAT2	1
PF_06835919	Lipides	Inhibiteur de la ketohexokinase	1
NGM313	Lipides	FGF21 mimétique	1
BMS_986171	Lipides	Mimétique FGF21 (PEG-FGF21)	1
Selnosertib (GS-4997)	Inflammation	inhibiteur de ASK1	3
Cenicriviroc	Inflammation	Antagoniste CCR2-CCR5	3
IMM124E	Inflammation	Thérapie anti-LPS	3
GR_MD_02	Inflammation	Inhibiteur de la Galectine	3
Emricasan (PF-03491390)	Inflammation	Inhibiteur des caspases	2b
Nitazoxanide	Inflammation	Activation des cellules stellaires	2b
GRI_0621	Inflammation	Inhibiteur des natural killers	2a
Tipelukast (MN_001)	Inflammation	Inhibiteur de la 5-lipoxygenase	2a
Nalmefene (JKB121)	Inflammation	Antagoniste des récepteurs aux opioïdes et du TLR4	2a
ForalumAB	Inflammation	Anti-corps mono clonal anti-CD3	2a
CER_209	Inflammation	Agoniste P2Y13	1

Nom	Cible	Mode d'action	Phase Clinique
Ocaliva (OCA)	Acides biliaires	Agoniste FXR	3
GS9674	Acides biliaires	Agoniste FXR	2b
NGM282	Acides biliaires	FGF19 mimétique	2b
Tropifexor (LJN452)	Acides biliaires	Agoniste FXR	2b
Volixibat (SHP626)	Acides biliaires	Inhibition du transport ASBT-dépendant	2b
LMB763 (LMB763)	Acides biliaires	Agoniste FXR	2b
Elobixibat (A4250)	Acides biliaires	Inhibiteur du transport illégal des acides biliaires	2a
Tern_101	Acides biliaires	Agoniste FXR	2a
Semaglutide	Glucose	Analogue du GLP1	2b
LIK066	Glucose	Inhibiteur SGLT1-SGLT2	2a
SAR425899	Glucose	GLP1 mimétique	2a
Sotaglifozin	Glucose	Double inhibiteur SGLT1/SGLT2	2a
MGL_3196	Autre	Antagoniste THR-β	2b
VK2809	Autre	Agoniste des récepteurs aux hormones thyroïdiennes (pro-drogue)	2a
MT_3995	Autre	Antagoniste des récepteurs à l'aldostérone	2a
Namodenson	Autre	Agoniste des récepteurs α3 Adrénérge	2a
DF102 (AF102)	Autre	?	2a
KBP_042	Autre	Double agoniste des récepteurs à l'amyline et la calcitonine	1
DUR928	Autre	Modifications épigénétiques	1
Namcizum	Autre	Modulateur allostérique des récepteurs CB1	1

Tableau 6 : Liste des molécules en développement clinique pour le traitement de la NASH.

Source : www.nashbiotech.com

Les molécules en développement clinique sont nombreuses. Dans un souci de simplification nous avons choisi de nous focaliser sur les molécules les plus prometteuses des groupes 1 (métabolisme lipidique), 2 (inflammation) et 3 (métabolisme des acides biliaires).

Elafibranor ou GFT505 : L'Elafibranor est un agoniste mixte PPAR α/δ . Le traitement avec cette molécule permet de limiter les atteintes hépatiques dans un modèle murin de NASH (Staels et al., 2013). De plus, dans un modèle murin de stéatose hépatique et de diabète de type 2 (*Db/Db*) le traitement avec le GFT505 permet de normaliser le métabolisme glucidique ainsi que les taux de lipides circulants (Hanf et al., 2014).

Chez des patients atteints d'un syndrome métabolique, le traitement à l'Elafibranor permet de diminuer les taux plasmatiques de TG, d'augmenter les taux circulants de HDL-Cholestérol ainsi que de normaliser le métabolisme glucidique et d'augmenter la sensibilité à l'insuline (Cariou et al., 2011, 2013).

Une étude multicentrique en intention de traiter a permis de mettre en évidence que l'Elafibranor permettait de stopper la progression de la fibrose chez des patients atteints de NASH (Ratziu et al., 2016).

Selnosertib : Le Selnosertib est une molécule bloquant la voie Apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1). La voie ASK1 est impliquée dans la réponse cellulaire aux ERO, dans un contexte de NASH l'activation de cette voie est un évènement clef dans la progression de la cascade pathologique (Xiang et al., 2016). Un essai clinique de phase 2 a montré que le traitement au Selnosertib permettait, dans 43% des cas, de réduire la fibrose hépatique d'au moins un stade.

Ocaliva : L'Ocaliva ou acide obéticholic (AOC) est un dérivé semi-synthétique d'acide biliaire qui agit comme un agoniste du farnesoid X receptor (FXR). Le FXR est impliqué dans la régulation du métabolisme glucidique et lipidique.

Chez l'animal, un traitement avec l'AOC améliore la sensibilité à l'insuline et le métabolisme glucidique. Un petit essai randomisé de phase 2 a permis de mettre en évidence que le traitement à l'AOC permettait d'améliorer la sensibilité à l'insuline d'environ 25% ainsi que de diminuer les concentrations d'enzymes hépatiques circulantes (Mudaliar et al., 2013). Cependant le design de cet essai n'a pas permis de mettre en évidence un effet du traitement sur la fibrose hépatique c'est pour quoi, un essai de phase 3 est actuellement en cours de recrutement.

E. Cirrhose hépatique

1. Caractéristiques

Bien que d'origines multiples la cirrhose hépatique résulte toujours d'une agression chronique du foie comme lors de maladies de surcharge en fer (Hémochromatose) ou en cuivre (maladie de Wilson), d'agressions virales chroniques (hépatites B ou C), de maladies auto-immunes, d'abus d'alcool ou de surcharge lipidique dans le cadre de la NASH.

Lors de la progression de la NASH vers la fibrose, les processus cicatriciels sont amplifiés conduisant à une cicatrisation dérégulée et donc à une accumulation du tissu cicatriciel. Au cours de ce phénomène il y a formation de nodules cicatriciels : les hépatocytes qui régénèrent se retrouvent encapsulés au sein d'un nodule constitué de tissu fibreux.

Il existe deux types de cirrhose : les cirrhoses compensées, asymptomatiques et les cirrhoses décompensées ou compliquées. Les cirrhoses décompensées sont diagnostiquées suite à la survenue de symptômes imputables à la diminution de la fonction hépatique globale.

Parmi les complications les plus fréquentes on retrouve les hémorragies digestives hautes dues à la rupture de varices œsophagiennes générées par une hypertension portale, un ictère, des œdèmes, des troubles de la coagulation, une sensibilité accrue aux infections bactériennes ou une encéphalopathie hépatique. Ce type d'encéphalopathie est dû à l'incapacité du foie à éliminer l'ammoniaque produit par les bactéries.

Outre le risque de décompensation la cirrhose constitue un terrain favorable au développement d'un CHC dont la survenue se fait après 15 à 20 ans d'évolution.

2. Prévalence et traitement

Dans le contexte du SMe, l'évolution de la NASH vers la cirrhose concerne environ 25% des patients (Diehl and Day, 2017). En revanche, la proportion de patients qui développent un CHC reste inconnue (Diehl and Day, 2017).

Afin de limiter la progression de la cirrhose la normalisation du SMe, notamment par des mesures hygiéno-diététiques doit être associée à des thérapies combinées ciblant les différents *hits*. Lors d'un

tel traitement, la survenue d'un CHC doit être surveillée. Si un CHC se développe, un traitement au Sorafenib permet d'améliorer la survie sans bénéfices cliniques (Gao et al., 2015). Cependant, le seul traitement efficace de la cirrhose ou du CHC reste la transplantation hépatique.

3. Génétique et épigénétique du NAFLD

Les causes du NAFLD sont principalement environnementales, cependant, il existe une susceptibilité familiale au développement de la NAFLD : 18% des patients atteints de NAFLD ont un parent au premier degré présentant les mêmes symptômes (Willner et al., 2001). Dans le cas d'enfants présentant une stéatose, 78% des parents et 59% des sœurs et frères sont aussi atteints (Schwimmer et al., 2009). Ces résultats suggèrent qu'il existe des variants génétiques favorisant l'apparition ou la progression du NAFLD.

En utilisant une approche de genome wide association (GWAS), deux études publiées dans les années 2010 font pour la première fois état de locus associés à la sévérité des atteintes hépatiques au cours du NAFLD (Chambers et al., 2011; Yuan et al., 2008). Plusieurs autres études ont ensuite été conduites notamment par Speliotes *et al.* et Romeo *et al.* (Romeo et al., 2008; Speliotes et al., 2011) malgré la diversité ethnique des cohortes utilisées pour ces études et les méthodes de diagnostic, un polymorphisme dans le gène codant pour la triglycéride lipase hépatique patatin-like phospholipase domain-containing 3 (*Pnpla3*) est constamment associé de façon significative à la stéatose. Ce polymorphisme est responsable d'une substitution Ile148Met, chez l'Homme, cette mutation augmente le risque de stéatose de façon indépendante de l'obésité (Kotronen et al., 2009).

Un modèle de souris surexprimant la mutation Ile148Met spécifiquement dans les hépatocytes présente une accumulation de triglycérides entraînant une stéatose (Li et al., 2012).

Ces résultats suggèrent donc que cette mutation ponctuelle du gène *Pnpla3* pourrait être directement responsable d'une forme « génétique » de stéatose et confirme fonctionnellement les données établies par les études GWAS.

A titre d'exemple, en plus du polymorphisme de PNPLA3, Speliotes et al. ont identifié quatre autres gènes présentant un polymorphisme :

-**NCAN (rs2228603)** : ce gène code pour le chondroïtine sulfate proteoglycan 3 ou neurocan. Cette protéine est connue pour être impliquée dans la modulation de l'adhésion et de la migration cellulaire, notamment au niveau du système nerveux central et de la rétine (Zhang et al., 2003).

-**GCKR (rs780094)** : ce gène code pour la glucokinase regulatory protein. Cette protéine participe à la régulation de l'activité de la GK (Farrelly et al., 1999). De façon intéressante, une autre étude de GWAS a pu mettre en évidence qu'un polymorphisme dans ce même gène est significativement associé à une augmentation des TG couplée à une diminution des taux de glucose circulants (Beer et al., 2009).

-**LYPLAL1 (rs12137855)** : ce gène code pour la lysophospholipase-like 1, cette lipase hydrolyse principalement les AG à chaîne courte comme le 4-nitrophényl-acétate (Bürger et al., 2012).

-**PPP1R3B (rs4240624)** : PPP1R3B est un gène impliqué dans la régulation de la dégradation du glycogène. En effet, cette protéine inhibe la déphosphorylation (*i.e.* l'inactivation) de la glycogène phosphorylase (Doherty et al., 1995).

Dans cette étude, la majorité des SNP identifiés sont en lien avec le métabolisme gluco-lipidique. Cependant, seule l'étude fonctionnelle de ces polymorphismes permettra de valider les corrélations obtenues lors du GWAS.

Actuellement, la génétique seule n'est pas suffisante pour expliquer l'apparition et la progression des pathologies, en particulier dans le cadre du NALFD. L'expression des gènes peut aussi être régulée par des phénomènes épigénétiques.

Le terme épigénétique regroupe tous les phénomènes responsables de la modulation de l'expression des gènes sans modification de la séquence d'ADN. Les régulations épigénétiques sont divisées en deux classes : la première classe regroupe les méthylations de l'ADN au niveau des îlots CpG et la seconde les modifications d'histones.

La méthylation de l'ADN consiste en l'ajout d'un groupement méthyl sur une cytosine suivie d'une guanine (îlot CpG) par les DNA methyltransferases (DNMT). Les DNMT utilisent principalement la méthionine et la choline comme source de méthyl. Les deux principales enzymes sont la DNMT1 et la DNMT3. DNMT1 est responsable du maintien des profils de méthylation au cours de la division cellulaire alors que DNMT3 est responsable de la méthylation *de novo* de l'ADN.

La méthylation de ces sites participe directement à la régulation de la transcription : une hyperméthylation est associée à la répression de l'expression des gènes alors que l'hypo-méthylation entraîne une augmentation de l'expression.

Chez la souris, l'altération de l'expression des DNMTs hépatiques précède le développement de la stéatose (Pogribny et al., 2009). Chez l'Homme, la méthylation des îlots CpG participe à la progression du NAFLD : chaque stade de la cascade est associé à un profil de méthylation particulier (Murphy et al., 2013). De façon intéressante, après une chirurgie bariatrique le profil de méthylation est modifié, ce qui pourrait expliquer le retour de la sensibilité à l'insuline au cours de la perte de poids (Ahrens et al., 2013). De la même façon, la méthylation de l'ADN mitochondrial est aussi associée à la sévérité du NAFLD (Pirola et al., 2013). De plus la méthylation de l'ADN est un caractère transmissible ce qui peut expliquer la fréquence élevée du NAFLD au sein de certaines familles.

Les modifications des histones ont lieu au niveau de la queue Nter des histones et peuvent prendre la forme d'acétylation, méthylation, phosphorylation, ubiquitinylation, ribosylation, biotinylation ou sumoylation. La méthylation des histones est régulée par les enzymes HMTs (histones methyl transferase) et HDMs (histones demethylases), de même, les enzymes HAT (histones acétyltransferases) et HDAC (histone deacetylase) sont responsables des niveaux d'acétylation des histones. De façon canonique, une acétylation des histones permet une ouverture de la chromatine et favorise ainsi l'initiation de la transcription. Au contraire, la dé-acétylation des histones « ferme » l'hélice d'ADN ce qui inhibe la transcription. Chez les mammifères, l'acétylation des histones est sous la dépendance de la conversion enzymatique du citrate en acétyl-CoA par l'ACLY (Wellen et al., 2009). Ce mécanisme lie de façon forte le métabolisme des nutriments au contrôle épigénétique de l'expression des gènes.

Parmi les nombreuses HDAC décrites, l'HDAC3 se situe au carrefour entre le métabolisme lipidique, les rythmes circadiens et l'épigénétique. En effet, un modèle murin présentant une perte de fonction de HDAC3 présente une augmentation de l'utilisation des lipides entraînant une sensibilité à l'insuline accrue ainsi qu'une dépense énergétique diminuée (Alenghat et al., 2008).

Cependant, la délétion de HDAC3 spécifiquement dans les hépatocytes entraîne une sévère stéatose associée à une amélioration de la sensibilité à l'insuline sans modification du poids corporel (Sun et al., 2012). En effet, HDAC3 participe à l'inhibition de la voie de la LDN en collaboration avec REV-ERB α (Feng et al., 2011). Tous ces résultats suggèrent que la progression du NAFLD est intimement liée à l'intégration d'un grand nombre de signaux provenant de l'environnement extérieur mais aussi internes.

4. Modèles d'études

Le NAFLD est une pathologie d'évolution lente et complexe. Pour modéliser son évolution, différents modèles « séquentiels » ont été mis en place : la stratégie repose sur l'utilisation d'une approche permettant de modéliser des atteintes retrouvées lors des stades précoces (obésité, insulino-résistance et stéatose).

A l'heure actuelle les modèles physiopathologiques murins pertinents sont rares. En effet, il n'existe pas de modèle permettant de reproduire l'évolution de la cascade pathologique (**tableau 7**). A l'heure actuelle les approches mises en place permettent d'étudier l'évolution de cette pathologie de façon séquentielle, en effet, les modèles high fat diet (HFD), *Ob/Ob*, *Db/Db* permettent de modéliser la progression de la stéatose sans fibrose. Au contraire, les approches utilisant des régimes déficients en choline et/ou méthionine permettent de modéliser le développement d'atteintes hépatiques ressemblant au NASH humain.

Cependant, la stéatose induite par les régimes déficients en choline et méthionine est indépendante de l'activité de la voie de la LDN, en effet la privation en méthionine et choline, acides aminés essentiels à l'export des VLDL par le foie, provoque une stéatose extrêmement rapide (quelques jours) et sévère. Ce type de régime a longtemps été associé à une fonte massive du tissu adipeux, depuis la supplémentation en lipides (CD-HFD60%) ou en amidon (CD-HFD45%) et l'ajout de méthionine (0,1%) l'effet lipodystrophique de ces régimes a été diminué.

A l'heure actuelle seuls deux régimes associent stéatose, fibrose et altération du métabolisme glucidique : les régimes CD-HFD45% et le régime high cholestérol. Cependant, ces deux approches ne sont capables d'induire de la fibrose hépatique qu'après au moins huit semaines de régime ce qui peut constituer un frein majeur à leur utilisation.

Modèle	Détails	Obésité	Stéatose	NASH	Fibrose	CHC
High-fat diet	45–60% de l'apport calorique provient des lipides.	Oui	Oui	Non	Non	Non
ob/ob mice	NA	Oui	Oui	Non	Non	Non
db/db mice	NA	Oui	Oui	Non	Non	Non
db/db mice + DEN	NA	Oui	Oui	Oui	?	Oui
Régime déficient en méthionine et choline (MCD)	Régime sans choline ni méthionine	Non	Oui	Oui	Oui	Non
High-cholesterol diet	1% de l'apport calorique provient du cholestérol.	Oui	Oui	Oui	Oui	Non
High fat diet 60% déficient en choline (CDHFD45%)	60% de l'apport énergétique provient des lipides. Régime sans choline	Non	Oui	Oui	Oui	Oui
High fat diet 45% déficient en choline (CDHFD45%)	45% de l'apport énergétique provient des lipides. Régime sans choline.	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui
High-fat diet + streptozotocin	Modèle de diabète de type 1 combine à du high fat diet 60%	Non	Oui	Oui	Oui	Oui

Tableau 7 : Principaux modèles physiopathologiques utilisés dans les études sur le NAFLD.
Adapté de (Lau et al., 2017).

L'expression des acteurs de la voie de la LDN est régulée à deux niveaux. Le premier niveau de régulation se situe au niveau de l'activité propre des différents facteurs de transcription qui régulent l'expression des enzymes de la LDN, en effet ces protéines peuvent subir des modifications post traductionnelles qui affectent directement leur activité.

Le second niveau de régulation, est permis par la capacité des facteurs de transcription à lier leurs éléments de réponse sur la chromatine. L'accessibilité des éléments de réponses est directement liée

à la conformation fine de la chromatine et notamment à son état de compaction. Cet état est principalement régulé par les histones, cependant, il existe une autre classe de protéines, moins connue, capables de réguler la compaction de l'ADN : la famille des protéines non histone high mobility group proteins (HMG).

F. HMG protéines

Les protéines HMG (High Mobility Group) sont des protéines nucléaires non histones de faible poids moléculaire (10-30 kDa) découvertes dans les années 1970. L'étude de leur composition en acides aminés révèle qu'elles sont constituées de 50% d'acides aminés chargés et cette constitution particulière leur confère une grande mobilité électrophorétique (Goodwin et al., 1973).

Les protéines HMG regroupent différentes super-familles : HMGA, HMGN et HMGB (Fig 21).

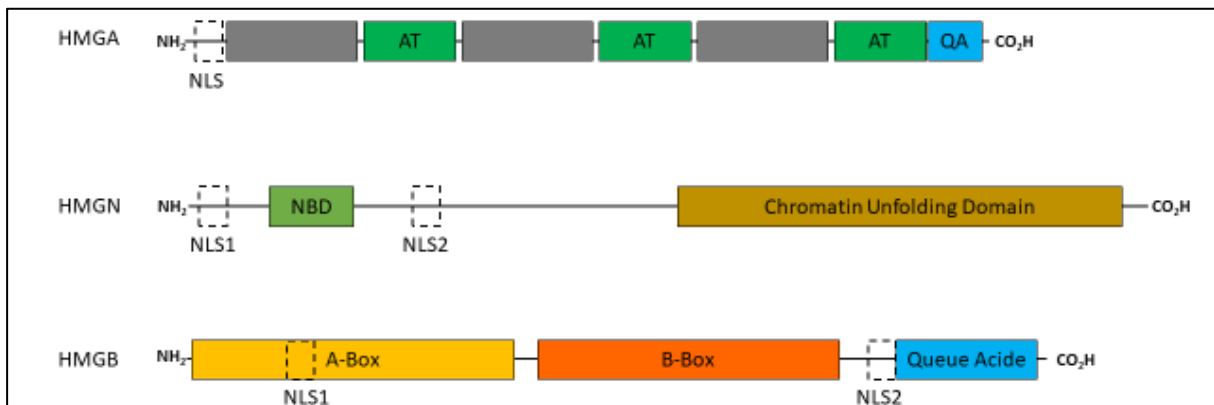


Figure 21 : Structure générale des protéines HMG.

Les protéines HMG sont des protéines de faible poids moléculaire. Cette famille de protéines est caractérisée par la présence de séquence de nucléarisation (NLS) ainsi que de différents motifs (AT, Chromatin unfolding domain ou A et B box) leur permettant d'interagir avec l'ADN. HMGA: high mobility group protein A, NLS: nuclear localisation sequence, AT : domaine d'interaction à l'ADN (A-T hook), QA : queue acide, HMGN high mobility group protein A, NBD : nucleosome binding domain, HMGB : high mobility group box protein.

1. HMGA

La famille des high mobility group protein A (HMGA) (Lund et al., 1983) comporte 4 membres : HMGA1a, HMGA1b, HMGA1c et HMGA2 codés par les gènes *Hmga1* et *Hmga2*. HMGA1a, HMGA1b et HMGA1c dérivent de l'épissage alternatif de l'ARNm du gène *Hmga1* (Johnson et al., 1989; Nagpal et al., 1999). L'expression de ces deux gènes est principalement embryonnaire puis diminue au cours de la maturation des tissus. De façon surprenante, lors de processus néoplasiques, les protéines HMGA sont ré-exprimées (Xu et al., 2004). Ces protéines ont en commun d'interagir avec le petit sillon de l'hélice d'ADN dans des régions riches en A et T (Solomon et al., 1986). Elles sont localisées au niveau des bandes G/Q des chromosomes, les centrosomes et les télomères. Ces différentes localisations sont en faveur d'un rôle actif des protéines HMGA dans la conformation de la chromatine (Disney, 1989).

L'interaction entre les protéines HMGA et l'ADN se fait de façon conformation dépendante *via* un motif « A-T Hook » (Reeves and Nissen, 1990).

Les interactions HMGA:ADN sont régulées par la phosphorylation de thréonines par la kinase CDC2. Une hyper-phosphorylation d'HMGA est associée à une diminution de l'affinité de la protéine pour l'ADN (Reeves et al., 1991). Au contraire, une hypo-phosphorylation augmente l'affinité d'HMGA pour l'ADN (Diana et al., 2001).

Malgré cette interaction séquence-indépendante, l'inactivation de ces gènes a des conséquences variables. Chez l'homme et la souris, l'absence du gène *Hmga1* entraîne une résistance à l'insuline et un diabète de type II (Foti et al., 2005) alors même que son expression est faible dans les tissus matures. Un modèle murin d'haplo-insuffisance du gène *Hmga* développe une hypertrophie cardiaque ainsi que des leucémies (Fedele et al., 2006).

Au contraire, la surexpression forcée de la protéine HMGA dans un modèle cellulaire entraîne l'apoptose (Fedele et al., 2001).

Ces effets différents peuvent notamment être dus au rôle des protéines HMGA1 dans la constitution de « l'enhanceosome ». L'enhanceosome peut se définir comme l'assemblage des éléments *cis* régulateurs, les modifications locales de la chromatine et le recrutement de la machinerie de l'ARN polymérase II au promoteur d'un gène (Panne, 2008). HMGA1 permet notamment la constitution de l'enhanceosome de l'interféron bêta : la liaison des différents activateurs se fait avec une faible affinité due à une courbure de l'ADN défavorable. La liaison d'HMGA « linéarise » l'ADN ce qui augmente l'affinité des activateurs avec la séquence promotrice, sans interaction protéine-protéine directe avec HMGA1. La stabilisation de la structure nucléoprotéique se fait par des interactions protéines-protéines entre les différents constituants. La structure ainsi stabilisée est l'enhanceosome (Yie et al., 1999). La formation ou la destruction de l'enhanceosome est en partie régulée par l'acétylation de deux lysines d'HMGA1 : l'acétylation de la lysine 71, associée à la formation de l'enhanceosome, et l'acétylation de la lysine 65, associée à la destruction du complexe nucléoprotéique (Munshi, 2001).

Les HMGA étant des protéines impliquées dans la transcription de certains gènes, elles peuvent donc être considérées comme des coactivateurs pan-génomiques de la transcription. Cependant les signaux conduisant au recrutement de ces protéines au niveau de leurs sites d'action sont inconnus.

2. HMGN

La superfamille des high mobility group protein N (HMGN) se compose de 6 membres, présents uniquement chez les vertébrés : HMGN1, HMGN2, HMGN3a, HMGN3b, HMGN4 et HMGN5. Ces protéines sont codées par les gènes *Hmgn1*, *Hmgn2*, *Hmgn3*, *Hmgn4* et *Hmgn5* respectivement. L'effet de la délétion de ces différents gènes (Kugler et al., 2013) est résumé dans le **Tableau 8**.

<i>Hmgn1</i> ^{-/-}	<i>Hmgn2</i> ^{-/-}	<i>Hmgn3</i> ^{-/-}	<i>Hmgn5</i> ^{-/-}
-Altérations comportementales	-Altérations comportementales	-Altérations comportementales	-Altération du métabolisme glucidique
-Diminution de la réparation des dommages à l'ADN	-Diminution de la force musculaire	-Diabète modéré	-Diminution de la fonction hépatique
-Diminution de la corticostéronémie (Femelles uniquement)	-Diminution du poids et de la masse grasse	-Diminution de la force musculaire	-Diminution de l'hématopoïèse
	-Hypophagie	-Hypoalgie	

Tableau 8 : Phénotype des différents modèles murins de déficience en *Hmgn1*, *Hmgn2*, *Hmgn3* et *Hmgn5*.

Leur principale fonction est de participer à la structure de la chromatine en se liant au nucléosome (Mardian et al., 1980). Le nucléosome est l'unité de base de la chromatine, chaque nucléosome est constitué de 147 paires de base d'ADN enroulées autour d'un octamère d'histones contenant deux copies des histones H2A, H2B, H3 et H4. La liaison d'HMGN se fait au niveau de l'octamère d'histones. Dans un contexte de transcription et/ou de traduction de la molécule d'ADN, les protéines HMGN ont une action opposée à celle des histones H1. En effet, HMGN favorise l'ouverture de la chromatine donc la transcription et/ou la traduction (Bustin, 2001), HMGN peut donc être considéré comme un coactivateur translationnel pan-génomique. La liaison HMGN:nucléosome est régulée par des modifications post-traductionnelles du domaine de liaison au nucléosome (NBD). Ainsi, l'acétylation d'HMGN sur des résidus lysine diminue sa liaison au nucléosome (Herrera et al., 1999). De la même façon, la phosphorylation de résidus sérines, localisés dans le NDB, a pour conséquence une relocalisation d'HMGN du noyau vers le cytoplasme (Louie et al., 2008).

L'interaction HMGN:Nucléosome est régulée de façon temporelle : il existe une phosphorylation cycle-cellulaire dépendante. Lors de la mitose, HMGN est phosphorylé ce qui inhibe sa liaison sur les chromosomes mitotiques et permet une meilleure circulation dans le noyau (Cherukuri et al., 2008; Prymakowska-Bosak et al., 2001).

De par son interaction avec le nucléosome, HMGN est un acteur essentiel du « code des histones » : l'encombrement stérique généré par HMGN empêche l'accès des histones acétyl- et méthyl-transférases (Lim et al., 2004).

3. HMGB

a) HMGB2, 3 et 4

Les high mobility group box proteins (HMGB) peuvent être divisées en deux classes selon leur type d'interaction à l'ADN. La première classe regroupe des protéines ayant une interaction séquence spécifique avec l'ADN comme les facteurs de transcription lymphoid enhancer-binding factor (LEF) et sex-determining Region of Y chromosom (SRY) notamment.

La seconde classe regroupe des protéines n'ayant pas d'interaction séquence spécifique avec l'ADN. Elle est composée de 4 membres : HMGB1, HMGB2, HMGB3 et HMGB4 codés par les gènes *Hmgb1*, *Hmgb2*, *Hmgb3* et *Hmgb4*.

- HMGB2 est principalement exprimée durant l'embryogenèse. A l'âge adulte son expression est réduite au thymus et aux testicules où elle joue un rôle crucial dans la spermatogenèse (Ronfani et al., 2001).

- L'expression de HMGB3 est cantonnée aux cellules hématopoïétiques primaires de la moelle osseuse. HMGB3 inhibe la différenciation des lignées myéloïde et lymphocytaire B (Nemeth, 2003).

- HMGB4 est le dernier membre identifié. Son expression est majoritairement testiculaire (Catena et al., 2009) et neuronale (Rouhiainen et al., 2016) à l'âge adulte.

De toutes les protéines HMGB, la délétion d'HMGB1 est celle qui présente le phénotype le plus marqué.

En effet, les animaux présentant une délétion constitutive du gène *Hmgb1* (*Hmgb1*^{-/-}) ont un phénotype léthal dû, notamment, à une sévère hypoglycémie post-natale (Calogero et al., 1999).

L'hypoglycémie est secondaire à un défaut de glycogénolyse hépatique, cependant, la machinerie enzymatique est présente dans le foie des animaux *Hmgb1*^{-/-}. La supplémentation en glucose des animaux *Hmgb1*^{-/-} toutes les six heures permet de prolonger la survie de 25 jours. Ces résultats suggèrent que l'effet d'HMGB1 sur le métabolisme glucidique bien que modéré est suffisant pour entraîner la létalité.

Avant l'apparition des stratégies de knock-out conditionnels, l'étude de cette protéine a pu se faire grâce à l'utilisation de mouse embryony fibroblast (MEFs) immortalisés *Hmgb1*^{-/-} (Calogero et al., 1999). L'utilisation de cette approche a permis de mettre en évidence que la protéine HMGB1 n'était pas essentielle à la survie et à la prolifération des cellules. Le phénotype des cellules *Hmgb1*^{-/-} suggère qu'HMGB1 permettrait de réguler l'accessibilité de l'ADN associé aux nucléosomes.

Bien que HMGB1 et HMGB2 partagent une forte homologie de séquence (80%), elles ne constituent pas un système redondant et pourraient même jouer des rôles opposés lors du développement (Bagherpoor et al., 2017).

b) *HMGB1*

HMGB1 est une protéine de 215 acides aminés, clonée en 1991 (Merenmies et al., 1991), qui est la protéine non histone la plus abondante du noyau, dans les cellules mammifères on estime son nombre à 10⁶ copies par noyau.

Cette protéine est conservée dans une grande partie du règne du vivant : l'homologie de séquence entre les protéines HMGB1 des organismes modèles en biologie (*S.Cerevisiae*, *C.Elegans*, *X.Laevis*, *M.Musculus*, *D.Rerio*) est de 90% (**Fig 22**).

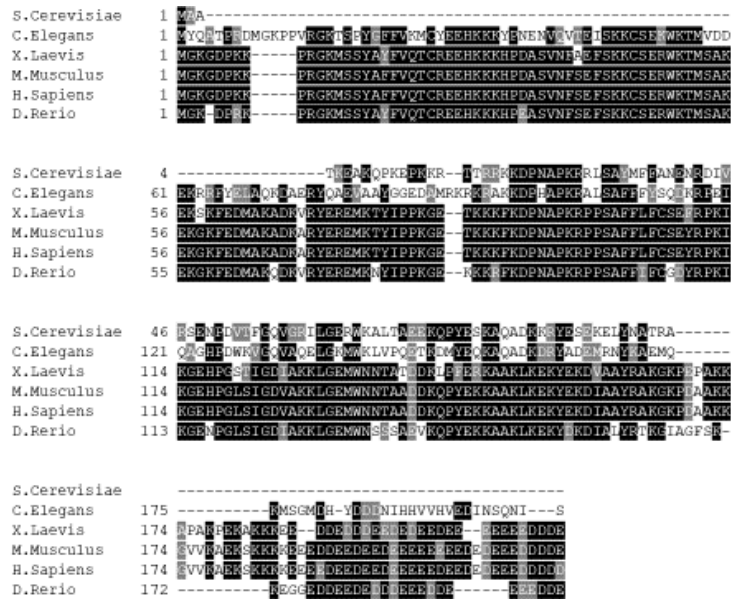


Figure 22 : Comparaison des séquences peptidiques des protéines HMGB1 chez S.Cerevisiae, C.Elegans, X.Laevis, M.Musculus, H.Sapiens et D.rerio.

Les acides aminés en noir sont conservés entre les différentes espèces.

(1) Structure Moléculaire

HMGB1 est caractérisée par la présence en tandem de deux sites d'interaction avec l'ADN de 80 acides aminés : les boîtes HMG (ou HMG Box) A et B. Les boîtes A et B ont une structure tertiaire identique formée par trois hélices α (Weir et al., 1993). Ces domaines interagissent avec le petit sillon de l'hélice d'ADN de façon peu ou pas spécifique. HMGB1 comporte deux séquences de nucléarisation (NLS) riches en lysines localisées entre les acides aminés 28 à 44 (NLS1) et 179 à 185 (NLS2).

La partie C-terminale de la protéine est composée d'une queue acide mobile de 30 acides aminés, principalement composée d'acides aspartique et glutamique (Fig 21).

Comme les autres protéines de type HMG, HMGB1 a d'abord été étudiée pour son rôle intracellulaire.

(2) Rôle intracellulaire

(a) Nucléaire

Dans le noyau, HMGB1 joue un rôle de chaperonne de l'ADN. Par ce rôle, HMGB1 est un des garants de la stabilité du génome eucaryote et procaryote (Giavara et al., 2005). L'affinité d'HMGB1 pour l'ADN varie en fonction des structures tertiaires rencontrées (Fig 23). L'affinité est plus

importante pour les conformations associées à des phénomènes de recombinaison ou de traduction/transcription que pour la conformation « classique ». Par exemple, *in vitro*, l'interaction HMGB1:DNA Loop (Matthews, 1992) a une demie vie d'une heure et une affinité forte ($K_D < 0,2 \times 10^{-12} \text{M}$) (Gaillard and Strauss, 2000). HMGB1 interagit aussi avec l'ADN cruciforme ($K_D = 1 \times 10^{-9} \text{M}$) (Bianchi et al., 1989). Pour comparaison, le K_D d'HMGB1 pour l'ADN de type B est de $5 \times 10^{-5} \text{M}$.

Chez les mammifères, les phénomènes de recombinaison de l'ADN sont rares et finement régulés. La recombinaison V(D)J est une recombinaison site-spécifique permettant de créer une grande diversité de T-Cell Receptor (TCR) et d'immunoglobulines (Ig) et cette recombinaison se fait par les recombinases RAG (Recombination Activating Gene). Bien que les RAG soient suffisantes pour induire la recombinaison, HMGB1 est nécessaire pour stabiliser le complexe RAG:ADN (Little et al., 2013). HMGB1 est aussi impliqué dans les phénomènes d'excision de nucléotides, et de réparation de mis-appariement (Lange and Vasquez, 2009).

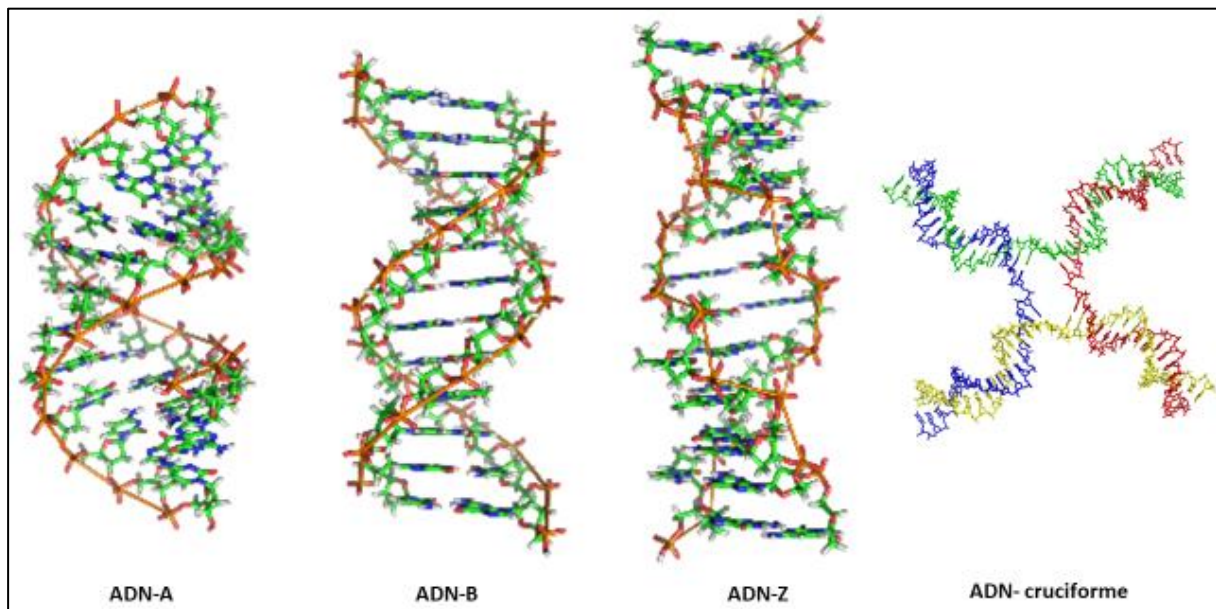


Figure 23 : Les différents types d'ADN retrouvés dans les cellules mammifères.

De gauche à droite : les structures de l'ADN-A, -B, -Z et de l'ADN cruciforme. Dans les cellules, l'ADN est majoritairement sous forme B. L'ADN-A est retrouvé dans des échantillons déshydratés et ressemble à l'ARN double brin ou aux hybrides ADN:ARN. L'ADN-Z est une structure plus rare, retrouvée lors des interactions ADN:Protéines. L'ADN cruciforme est un intermédiaire clef dans les processus de recombinaison homologue.

HMGB1 est impliqué dans la régulation indirecte de la traduction en permettant la décompaction de la chromatine : HMGB1 peut déstabiliser le nucléosome d'une manière non enzymatique et ATP indépendante. En effet, il peut exister une interaction entre la queue acide d'HMGB1 et la partie N-Ter de l'histone H3 (Watson et al., 2014), cette interaction va entraîner l'ouverture de la chromatine et la

déstabilisation du nucléosome. Une fois le nucléosome détruit, des éléments de réponses à des facteurs de transcriptions peuvent devenir accessibles et la traduction des gènes cibles peut s'effectuer, ce type de régulation est retrouvé dans le cas du récepteur aux œstrogènes. En cas d'inhibition de l'expression d'HMGB1, l'activité transcriptionnelle du récepteur aux œstrogènes est drastiquement diminuée (Joshi et al., 2012). Dans ce cas précis, HMGB1 joue le rôle de coactivateur spécifique de la transcription.

Dans un système bactérien hybride exprimant TATA Binding Protein humaine (hTBP), HMGB1 favorise la liaison et la stabilité du complexe TATA Binding Protein (TBP):TATA-Box. Cette stabilisation se fait via l'interaction entre la partie C-Ter d'HMGB1 (la queue acide) et la partie N-Ter de la hTBP (Das and Scovell, 2001). L'encombrement stérique généré va interdire l'accès à la TATA-Box de TFIID et ainsi inhiber la formation du complexe d'initialisation de l'ARN Polymérase II (Ge and Roeder, 1994).

HMGB1 est aussi impliqué dans la régulation de l'activité de certains facteurs de transcription. Ainsi, HMGB1 est impliqué dans la régulation directe ou indirecte de la liaison à l'ADN de nombreux facteurs de transcription ou récepteurs nucléaires tels que les récepteurs aux hormones stéroïdiennes, le récepteur aux glucocorticoïdes, NFκB mais aussi SREBP et p53.

HMGB1 semble interagir directement avec SREBP1 et SREBP2 au niveau des domaines helix-loop-helix (HLH), cette interaction pourrait être retrouvée pour d'autres facteurs possédant des domaines HLH. Cette interaction augmente l'activité transcriptionnelle de SREBP1 et SREBP2 en favorisant la dimérisation de ce facteur de transcription (Najima et al., 2005).

HMGB1 peut aussi interagir avec la protéine p53, dans ce cas, l'interaction entre ces deux protéines inhibe leur passage du cytoplasme vers le noyau. La séquestration de p53 dans le cytoplasme empêche l'expression de ses gènes cibles (Livesey et al., 2012). HMGB1 peut aussi directement faciliter l'interaction entre p53 et l'ADN en modifiant l'organisation spatiale des sites de liaison de p53 (McKinney and Prives, 2002)

Ainsi, HMGB1 est capable de réguler l'activité transcriptionnelle à plusieurs niveaux : soit en jouant sur l'ouverture et la fermeture de la chromatine, soit en interagissant directement avec certains facteurs de transcription ou éléments de la machinerie de transcription (**Tableau 9**).

Facteur de transcription	Famille	Interaction	Conséquences	Organisme	Références
SREBP	B-HLH-ZIP	HLH	Dimérisation	<i>Ex-vivo</i>	(Najima et al., 2005)
NF-κB	RHD	REL	Activation de la transcription	Drosophile	(Brickman et al., 1999)
p53	-	ADN cible et protéine : protéine	Augmente l'affinité pour les éléments de réponse à p53. Régule l'apoptose p53-induite	<i>Ex-vivo, in vitro</i>	(Livesey et al., 2012; McKinney and Prives, 2002)
Récepteur aux hormones stéroïdiennes	-	ADN cible	Augmente l'affinité pour les HRE	Singe (Lignée cellulaire COS)	(Boonyaratanakornkit et al., 1998; Joshi et al., 2012)
Récepteur aux glucocorticoïdes	Doigt de Zinc	?	Augmente l'activité	Souris	(Foti et al., 2005)

Tableau 9 : Effet d'HMGB1 sur les différents facteurs de transcription.

Srepb: Sterol regulatory element-binding protein; *NF-κB* : nuclear factor-kappa B; *B-HLH-ZIP*: Basic Helix-Loop-Helix leucine Zipper; *HRE*: Hormone Reponse Element.

HMGB1 est aussi impliqué dans la maintenance de la stabilité génomique. Chez les mammifères, la stabilité du génome est notamment assurée par la présence de télomères à l'extrémité des chromosomes. Ces séquences sont synthétisées par un complexe nucléoprotéique : la télomérase. Dans un modèle de MEF *Hmgb1*^{-/-} l'instabilité génomique est augmentée et l'activité de la télomérase est divisée par 3 (Polanská et al., 2012).

Outre ses divers rôles nucléaires, HMGB1 se distingue des autres protéines HMG par son rôle cytoplasmique.

(b) Cytoplasmique

De façon inattendue en 1979, lors de l'utilisation d'anticorps spécifiques d'HMGB1, Michael Bustin et Natasha Neihart rapportent un marquage positif dans le cytoplasme (Bustin and Neihart, 1979). Cette étude suggère pour la première fois un possible rôle extranucléaire pour HMGB1.

Il faut attendre 1991 pour voir la description du premier rôle cytoplasmique : HMGB1 est localisé à la membrane plasmique et favorise la croissance des neurites (Merenmies et al., 1991).

En 2010, Tang *et al.* (Tang et al., 2010) ont mis pour la première fois en évidence un potentiel rôle d'HMGB1 dans la régulation de l'autophagie. Leur modèle propose, au cours d'un stress induisant l'autophagie (*i.e.* privation en acides aminés), une relocalisation d'HMGB du noyau vers le cytoplasme. Une fois dans le cytoplasme, HMGB1 participe à la dissociation du complexe inhibiteur de l'autophagie BCL2:Beclin-I favorisant ainsi l'activation de l'autophagie par Beclin-I (Decuypere et al., 2012).

Ce lien entre autophagie et HMGB1 a été reproduit à plusieurs reprises et dans différents contextes :

1/ Au cours de la carcinogénèse, il existe une balance entre l'apoptose et l'autophagie. Cet équilibre est crucial pour la progression de la maladie et la réponse au traitement. *In vitro*, ces voies semblent régulées par l'interaction entre p53 et HMGB1 (Livesey et al., 2012), qui se fait aussi bien dans le noyau que dans le cytoplasme (**tableau 9**).

2/ HMGB1 pourrait aussi jouer un rôle dans le « contrôle qualité » des mitochondries *in vitro* (Tang et al., 2011). L'élimination des organites non fonctionnels se fait par des mécanismes associés à l'autophagie et l'élimination des mitochondries se fait *via* la mitophagie (Pickles et al., 2018). La régulation de la mitophagie par HMGB1 serait due à l'expression de la protéine Heat Shock Protein beta-1 (HSPB1) qui peut interagir avec le cytosquelette d'actine, élément essentiel dans la constitution des vésicules de l'autophagie. Ainsi dans ce modèle *in vitro*, HSPB1 régule le contrôle qualité des mitochondries et l'expression d'HSPB1 semble strictement dépendre de l'expression d'HMGB1.

3/ Lors d'une infection bactérienne (*Listeria monocytogenes*) ou d'un choc septique induit par le lipopolysaccharide (LPS), les souris présentant une délétion d'HMGB1 spécifiquement dans les macrophages sont plus sensibles que les souris wild type. Ces résultats laissent supposer un rôle anti-inflammatoire d'HMGB1 dans les macrophages. En effet, dans cette cellule l'absence d'HMGB1 est associée à une diminution de l'autophagie pouvant expliquer la sécrétion accrue de cytokines pro-

inflammatoires et une mort cellulaire précoce des macrophages pouvant être responsable de la sensibilité accrue à l'infection bactérienne ou au choc septique (Yanai et al., 2013).

Malgré la robustesse de ces études, il existe une controverse sur la réalité de l'autophagie médiée par HMGB1. En effet, dans un article publié en 2014, Huebener, Gwak *et al.* (Huebener et al., 2014) n'ont pas mis en évidence un quelconque rôle d'HMGB1 dans l'autophagie ou le contrôle qualité des mitochondries *in vivo*, en utilisant un KO spécifique des hépatocytes et un autre KO spécifique des cardiomyocytes. Cette différence de résultats pourrait en partie s'expliquer par la stratégie utilisée pour réaliser les délétions d'HMGB1. En effet, même si les deux groupes ont utilisé la technologie CRE-Lox pour réaliser la délétion, Tang et collaborateurs ont mis en place une stratégie reposant sur le floxage des exons 2 et 3 alors que Huebener, Gwak et collaborateurs ont réalisé le floxage des exons 2, 3 et 4.

Ces résultats contradictoires ont conduit certains auteurs à proposer l'existence de deux autophagies : l'une indépendante et l'autre dépendante d'HMGB1 (Huebener et al., 2015; Sun and Tang, 2014).

Dans le cytoplasme, la présence d'ADN est souvent synonyme d'infection. La détection de cet ADN se fait par la voie cGAS (**Fig 24**) La présence d'ADN dans le cytoplasme va activer l'enzyme cGAS (cyclic GMP-AMP Synthase) qui catalyse la formation d'un di-nucléotide cyclique : le guanosine-adénine monophosphate cyclique (cGAMP). HMGB1 en interaction avec d'autres protéines de structure, va permettre la nucléarisation du complexe cGAS:ADN et modifiant la conformation de l'ADN (Andreeva et al., 2017).

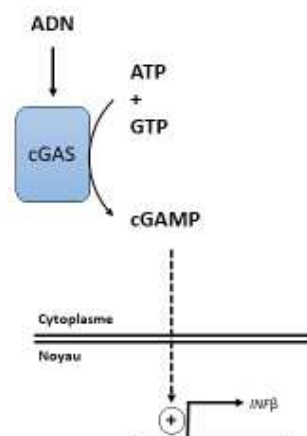


Figure 24 : Détection de l'ADN exogène par la voie cGAS.

Dans le cytoplasme, la présence d'ADN exogène active la cyclic GMP-AMP Synthase (cGAS). La production par cette enzyme de GMP-AMP cyclique (cGAMP) permet à terme la production d'interféron-bêta (INFβ).

Suite à une cascade de signalisation particulière, la formation de cGAMP aboutit à l'activation des gènes de la réponse immunitaire et notamment l'interféron bêta (INF β).

Dans ce contexte, HMGB1 constitue une « alarmine intracellulaire » permettant la lutte contre les pathogènes intracellulaires.

(c) Modifications post traductionnelles

HMGB1 est une protéine de structure de la chromatine pouvant circuler de façon physiologique entre le noyau et le cytoplasme. Bonaldi *et al.* (Bonaldi Tiziana et al., 2003) ont démontré que le transport nucléo-cytoplasmique d'HMGB1 se faisait soit de façon passive soit de façon active. Le transport passif est permis par la petite taille d'HMGB1, ce qui permet une diffusion passive par les pores nucléaires, cependant, ce mode de transport semble minoritaire.

Le transport actif se fait par l'interaction entre l'exportine CRM1 (Kang et al., 2009) et une séquence d'export nucléaire non identifiée à ce jour mais située dans les box A et B. L'import d'HMGB1 est médié par l'exportine KAP- α 1 (Youn and Shin, 2006).

Le choix de la localisation subcellulaire d'HMGB1 est dicté par de nombreuses modifications post traductionnelles (Fig 25).

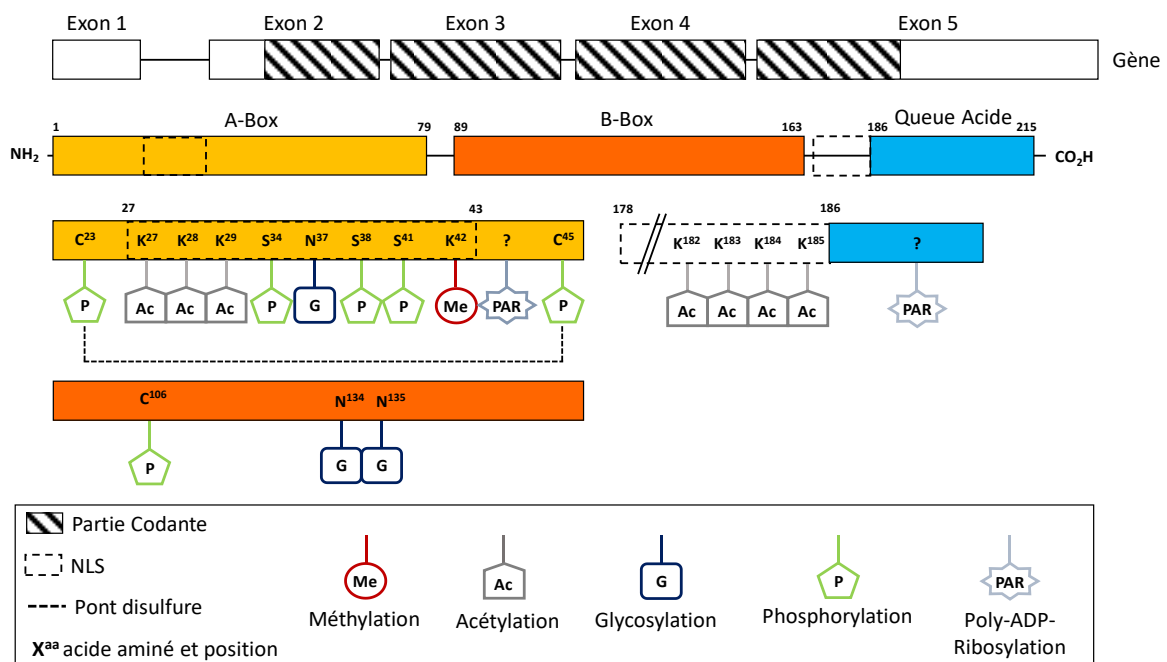


Figure 25 : Bilan des modifications post-traductionnelles d'HMGB1.

HMGB1 est codé par les exons 2, 3, 4 et 5. Les modifications post traductionnelles sont majoritairement situées dans la A-Box et en amont de la queue acide. Le pont disulfure formé entre les cytosines 23 et 45 permet l'interaction d'HMGB1 avec le TLR4.

(i) Méthylation

A ce jour, une unique méthylation a été décrite. Le site de méthylation se situe dans la NLS1 au niveau de la Lysine 42 (**Fig 25**). Dans les neutrophiles, cette lysine est monométhylée (Ito et al., 2007) et cette modification entraîne une relocalisation de la protéine vers le noyau. Le transport se fait par diffusion passive au travers des pores nucléaires grâce au petit poids moléculaire d'HMGB1 (25 KDa)

(ii) Phosphorylation

Lors de l'activation de cellules immunes par le TNF- α ou l'acide okadaïc (phycotoxine), HMGB1 est phosphorylée au niveau de la NLS1 ce qui inhibe l'interaction entre HMGB1 et l'importine nucléaire KAP- α 1 (Youn and Shin, 2006), permettant une relocalisation cytoplasmique et à terme une orientation vers les voies sécrétoires. La phosphorylation se fait sur trois résidus sérine localisés dans la NLS1 : les sérines 34, 38 et 41 (Kang et al., 2009) *via* l'action de la PKC (Protéine Kinase C) (**Fig 25**).

HMGB1 comporte trois résidus cystéines pouvant être phosphorylés : lorsque les cystéines 23 et 45 sont phosphorylées, elles forment un pont disulfure. Cependant, bien que situées de part et d'autre de la NLS1 (**Fig 25**) la formation du pont disulfure ne semble pas avoir d'effet sur la localisation cellulaire d'HMGB1 (Venereau et al., 2012).

En revanche, la phosphorylation de la cystéine 106, située dans la box-B entraîne une relocalisation cytoplasmique d'HMGB1 (Hoppe et al., 2006; Venereau et al., 2012).

(iii) Glycosylation et ADP-Ribosylation

HMGB1 possède trois asparagines glycosylables en position 37, 134 et 135 (**Fig 25**). Cette glycosylation constitue un prérequis pour sa sécrétion suite à un stimulus pro-inflammatoire. De plus, cette modification post-traductionnelle protège HMGB1 de la dégradation par le protéasome (Kim et al., 2016a). La Poly(ADP)-ribosylation (PAR) d'HMGB1 est médiée par la Poly(ADP)-ribose Polymerase-1 (PARP-1) (Ditsworth et al., 2007). L'action de cette enzyme se fait sur des résidus à ce jour inconnus mais probablement situés dans la boîte HMG-A et la queue acide. Cette modification a deux effets :

- Comme pour les autres modifications post traductionnelles, HMGB1 quitte le noyau pour le cytoplasme et rejoint les voies de sécrétion.

- Dans l'espace extracellulaire, PAR-HMGB1 va générer une diminution de l'efféroctyose. L'efféroctyose peut se définir comme le processus au cours duquel les cellules mourantes ou mortes sont phagocytées (Davis et al., 2011).

(iv) Acétylation

La première découverte de l'acétylation d'HMGB1 a été faite en 1979 (Sternner et al., 1979). En réponse à l'acétylation des lysines, HMGB1 est transloqué du noyau vers le cytoplasme pour être secrété.

Cette modification post-traductionnelle se fait sur des résidus lysine particuliers, localisés proche des NLS : les lysines 27, 28 et 29 (proches de la NLS1, **Fig25**) et les lysines 182, 183, 184,185 (proches de la NLS 2, **Fig 25**) (Bonaldi Tiziana et al., 2003). Les modifications se font principalement par les histones-acétyl transférase CBP, PCAF et p300 (Bonaldi Tiziana et al., 2003) sous le contrôle de la voie JAK/STAT1 (Lu et al., 2014).

Ces acétylations sont régulées par les déacétylases SIRTUIN1 (Rabadi et al., 2015) et HDAC1/HDAC4 (Evankovich et al., 2010).

Les nombreuses modifications post traductionnelles vont permettre d'orienter HMGB1 vers la voie sécrétoire. Une fois dans le milieu extracellulaire, HMGB1 joue le rôle de médiateur de l'inflammation.

(3) Rôle extracellulaire

(a) Sécrétion

A ce jour, deux modes de sécrétion d'HMGB1 ont été décrits : une sécrétion active par les cellules immunitaires activées lors d'un challenge inflammatoire ou un relargage passif lors d'un évènement nécrotique.

La sécrétion active se fait par les cellules immunitaires innées activées par un stimulus pro-inflammatoire (LPS, TNF- α ou IL-1) (Wang et al., 1999).

La structure protéique d'HMGB1 ne comportant pas de peptide sécrétoire, sa sécrétion se fait par une voie non canonique : la voie des lysosomes sécrétoires (Gardella et al., 2002).

Les lysosomes sécrétoires sont des vésicules sécrétoires issues du réseau trans-golgien. Elles sont principalement retrouvées dans les cellules immunes, notamment les macrophages et les cellules dendritiques. La fusion de ces particules avec la membrane et l'exocytose de leur contenu sont régulées par les flux intracellulaires de calcium (Blott and Griffiths, 2002).

Comme démontré par Wang *et al.* HMGB1 est un acteur tardif de la réponse immunitaire innée : la sécrétion d'HMGB1 *in vivo* atteint son maximum 15 heures après l'induction d'un choc septique par le LPS (Wang et al., 1999). En effet, la sécrétion d'HMGB1 par les cellules immunitaires nécessite, en plus d'un stimulus de type LPS, TNF- α ou IL-1, la présence de lysophosphatidine choline (LPC). Or, l'enzyme responsable de la production de LPC, la Phospholipase A2, n'est sécrété que 24h après un challenge inflammatoire (Gardella et al., 2002).

La sécrétion d'HMGB1 se fait donc en deux temps :

- 1/ HMGB1 est acétylé dans le noyau puis est transportée dans le compartiment endosomal,
- 2/ La présence de LPC permet une sécrétion d'HMGB1 *via* les lysosomes sécrétoires.

HMGB1 est aussi relargué passivement par les cellules nécrotiques et constitue un signal d'activation pour le système immunitaire (Scaffidi et al., 2002). La nécrose est une mort cellulaire non programmée, au cours de laquelle le contenu cellulaire est déversé dans le milieu extracellulaire. Au cours de ce phénomène HMGB1, qui tend à être hypo-acétylée, joue le rôle de médiateur de l'inflammation stérile ou de DAMPS (Damage Associated Molecular Pattern).

L'acétylation d'HMGB1 constitue donc un marqueur permettant de discriminer le phénomène à l'origine de son apparition :

- HMGB1 hyper-acétylé provient de la sécrétion par les cellules immunes activées après un challenge inflammatoire
- HMGB1 hypo-acétylé provient d'évènements nécrotiques.

Ainsi, HMGB1 peut donc constituer un marqueur clinique d'apoptose et/ou de nécrose notamment dans les cas d'insuffisance hépatique aiguë. Dans les pays industrialisés, 50% des cas d'insuffisance

hépatique aigüe sont dus à une intoxication à l'acétaminophène (Paracétamol) (Lee et al., 2008). Au cours de cette atteinte, les hépatocytes nécrosent ce qui entraîne une insuffisance hépatique aigüe pouvant entraîner le décès du patient. Dans ce contexte, HMGB1 constitue donc un marqueur de diagnostic fiable et prédictif de la sévérité de l'atteinte hépatique (Antoine et al., 2009, 2013).

La sécrétion active d'HMGB1 a longtemps été considérée comme l'apanage des cellules immunitaires. Cependant, des études ont pu mettre en évidence que certaines cellules épithéliales pouvaient aussi sécréter activement HMGB1. Suite à une stimulation au TNF- α , une lignée d'adipocytes murins en culture (les 3T3-L1) sécrète activement HMGB1 de façon dose dépendante *via* un mécanisme impliquant la voie des JNK (Shimizu et al., 2016).

L'irradiation aux rayons X de fibroblastes de peau ou de cellules épithéliales bronchiques provoque une sécrétion dose et temps dépendante. De façon intéressante, la sécrétion d'HMGB1 induite par les rayons X est liée à des dommages à l'ADN (Wang et al., 2016).

Dans des cellules de cancer du côlon, HMGB1 est phosphorylé par la PKC ζ pour être activement sécrété (Lee et al., 2012).

(b) Activation des cellules immunitaires

Une fois dans l'espace extracellulaire, HMGB1 va pouvoir activer les cellules inflammatoires innées, notamment les macrophages (Andersson et al., 2000) et les neutrophiles (Tadie et al., 2013) en se liant sur des récepteurs classiques de l'immunité (**Fig 26**).

RAGE : Identifié en 1992, le Receptor for Advanced Glycosylation End-products (RAGE) est un récepteur membranaire de 35kDa appartenant à la famille des immunoglobulines (Ig) (Neeper et al., 1992). Comme la plupart des récepteurs de type Ig, RAGE est composé d'un domaine variable (V) N terminal suivi de deux domaines constants (C1 et C2). La partie C terminale se compose d'une courte partie intracellulaire responsable de l'activation de la voie NF κ B, dans les cellules immunes, par un mécanisme RAS-p38MAPK dépendant (Huttunen et al., 1999; Lander et al., 1997).

RAGE peut lier des ligands très divers tels que les produits de glycation avancés (AGE) (Schmidt et al., 1992), HMGB1 (Hori et al., 1995; Kokkola et al., 2005) ou des alarmines de type S100A et S100B (Hofmann et al., 1999).

Un épissage alternatif de l'ARN messager permet la synthèse d'un récepteur sans segment transmembranaire, ce qui a pour conséquence d'entraîner la sécrétion du récepteur, on parle alors de Soluble RAGE (sRAGE) (Girón et al., 1998; Sárkány et al., 2011). Ce récepteur soluble permettrait de bloquer l'interaction entre RAGE et ses ligands, en particulier HMGB1, inhibant ainsi l'activation des cellules immunes (Blondonnet et al., 2017; Zhang et al., 2017a).

Les macrophages ont la capacité d'endocyter HMGB1 selon un mécanisme RAGE-dépendant. Une fois dans les lysosomes, HMGB1 est responsable de leur déstabilisation ce qui induit le déclenchement de la pyroptose. La pyroptose est une voie de mort cellulaire sous le contrôle d'une cascade médiée par la caspase 1 qui, au contraire de l'apoptose, induit une réponse inflammatoire (Cookson and Brennan, 2001).

TLR4 : le Toll Like Receptor 4 (TLR4) appartient à la super famille des TLR. Les TLR sont des récepteurs de l'immunité initialement découverts par Jules Hoffman chez *D.Melanogaster*. En 1997, Medzhitov et ses collaborateurs identifient le TLR4 (Medzhitov et al., 1997) chez l'Homme, puis en 1999 le ligand prototypique est identifié : il s'agit du LPS bactérien (Poltorak, 1998). Depuis, une vingtaine de ligands ont été identifiés et notamment HMGB1 (Park et al., 2006).

Suite à son activation le TLR4 va induire deux types de réponses (O'Neill et al., 2013) :

1/Une réponse précoce conduisant à la production de TNF- α . Cette réponse met en jeu une cascade Myd88-NF κ B,

2/Une réponse tardive conduisant à la production d'interféron. Cette réponse met en jeu une cascade TRIF-IRF3 et se met en place après l'endocytose du récepteur.

Dans un contexte d'ischémie/re-perfusion hépatique ou intestinale, l'interaction HMGB1:TLR4 est responsable de la mise en place de la nécrose induite par la re-perfusion (Tsung et al., 2005; Wang et al., 2015b). Cependant, la reconnaissance spécifique d'HMGB1 bisulfide par le TLR4 implique un partenaire obligatoire : l'adaptateur extracellulaire Myeloid differentiation factor 2 (MD-2) (Yang et al., 2015) ou CD14.

MD-2 (ou CD14) est le corécepteur du TLR4 nécessaire à l'activation de ce dernier par le LPS, pour ce faire, le LPS doit être transféré sur le CD14 soit par la LPS Binding Protein (LPB) soit par HMGB1.

Dans ce cas, il se pourrait que le TLR4 reconnaisse l'hétérodimère HMGB1:LPS (Youn et al., 2008). Ainsi, la liaison HMGB1-TLR4 est indispensable à la production de cytokines par les cellules immunes.

Lors d'une infection bactérienne, la liaison entre HMGB1 et le TLR4 des neutrophiles provoque la formation de NETs (Neutrophils Extracellular Traps). Les NETs sont des complexes nucléoprotéiques dont le composant majoritaire est l'ADN auquel sont associées des protéines des granules neutrophiliques (myéloperoxydase, lactoferrine, gélatinas) ainsi que des histones. Le rôle de ces filets est de piéger les bactéries et les débris cellulaires afin de faciliter leur destruction et leur phagocytose par les neutrophiles (Brinkmann, 2004). La formation de ces structures est sous la dépendance du TLR4. Ainsi, l'apparition des NETs peut être médiée par le LPS ou HMGB1 (Brinkmann, 2004; Tadie et al., 2013).

TLR9 : Le Toll Like Recepteur 9 découvert en 2000 lie les îlots CpG (Cytosine phosphate Guanine) de l'ADN (Hemmi et al., 2000). La reconnaissance d'îlots CpG par le TLR9 est le signe soit d'une nécrose cellulaire soit d'une infection bactérienne.

La voie de signalisation du TLR9 passe par NFκB et aboutit à la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-6 ou le TNF-α.

HMGB1 joue un rôle important dans la signalisation induite par le TLR9, en effet, HMGB1 est associé avec le TLR9 dans le réticulum endoplasmique et permet sa translocation vers la membrane plasmique en réponse à la détection d'îlots CpG (Ivanov et al., 2007). Dans l'espace extracellulaire, HMGB1 est lié aux îlots CpG et sa présence potentialise la liaison de l'ADN sur le TLR9 ainsi que la production de cytokines par les macrophages (Ivanov et al., 2007; Tian et al., 2007). L'activation de TLR9 induit la sécrétion active d'HMGB1 par les cellules dendritiques ou les macrophages (Ivanov et al., 2007).

CXCR4 : CXCR4 ou CD184, est le récepteur membranaire de la chimiokine CXCL12 (ou SDF-1), exprimé dans de nombreux types cellulaires notamment les leucocytes. La liaison entre CXCL12 et CXCR4 joue un rôle unique dans la régulation du trafic des leucocytes mais aussi dans l'hématopoïèse. HMGB1 peut former un complexe avec CXCL12 : l'interaction entre ces deux protéines induit un changement de conformation de CXCL12 ce qui augmente l'affinité pour son récepteur (Schiraldi et al., 2012). Cette cascade de signalisation est aussi décrite lors de phénomènes de cicatrisation : dans ce contexte, l'interaction HMGB1: CXCL12 favorise la régénération musculaire et hépatique (Tirone et al., 2017).

De par cette interaction, HMGB1 joue un rôle dans le recrutement et l'activation des cellules immunes.

De façon générale, HMGB1 a la capacité de potentialiser la liaison et la réponse intracellulaire de différents ligands sur leurs récepteurs (Hreggvidsdottir et al., 2009).

Dans leur étude, Tian *et al.* rapportent que les effets intracellulaires de la détection des îlots CpG sont médiés par une coopération entre le TLR9 et RAGE (Tian et al., 2007). Les études de Park *et al.* et Qin *et al.* (Park et al., 2006; Qin et al., 2009) montrent une action synergique des récepteurs TLR4 et RAGE dans l'induction de la réponse immunitaire. Tout se passe comme si HMGB1 servait à activer de multiples récepteurs de l'immunité en réponse à un stimulus unique, potentialisant ainsi la réponse immunitaire induite. Dans ce modèle, HMGB1 est une protéine « scaffold » extracellulaire.

Cependant, toutes ces études reposent sur l'utilisation de protéines recombinantes produites chez des bactéries. L'utilisation de tels produits sur des cellules immunitaires pose la question d'une éventuelle contamination par le LPS des protéines recombinantes qui pourrait être à l'origine de réponses artéfactuelles.

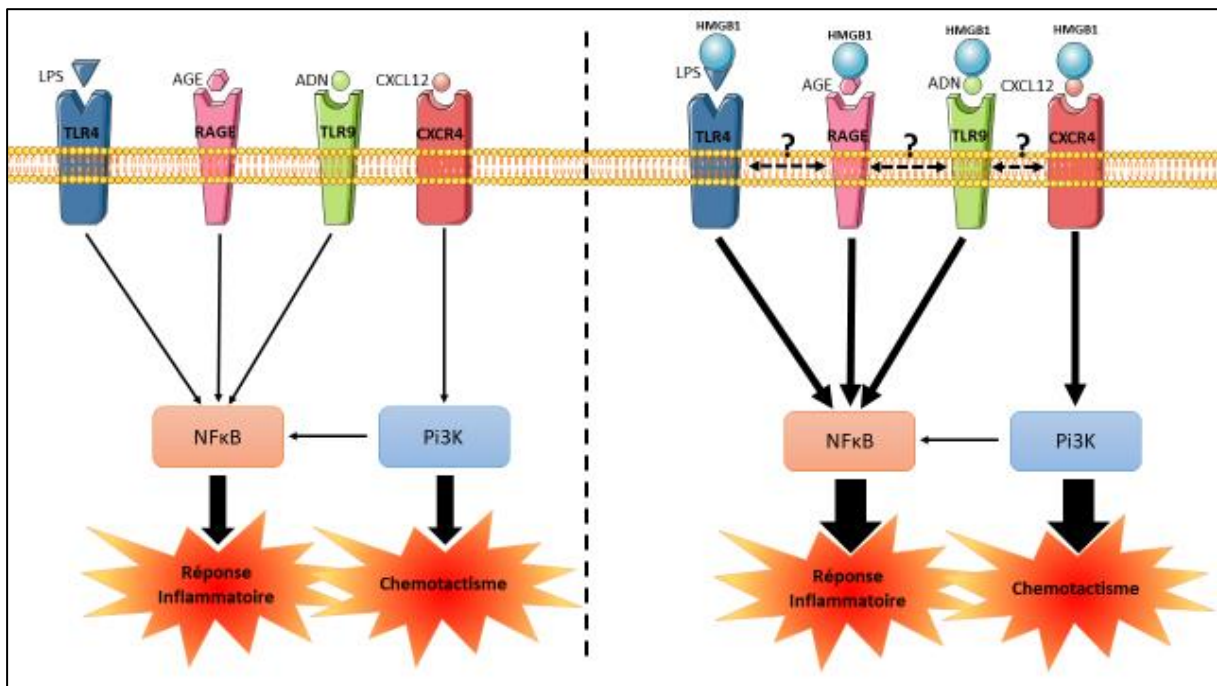


Figure 26 : Récepteurs et mode d'action d'HMGB1 au cours de la réponse immunitaire.

HMGB1 interagit avec de multiples récepteurs de l'immunité innée et pourrait permettre de potentialiser une réponse immunitaire. TLR4 : Toll-like receptor4, RAGE : receptor for advanced glycation end-products, TLR9 : toll-like receptor 9, CXCR4 : C-X-C chemokine receptor type 4, AGE: advanced glycation end-products, NFκB: nuclear factor-kappa B, PI3K: phosphoinositide 3-kinase

(c) Modes d'action et régulation

Pour être efficace et sans danger pour l'organisme, la réponse immunitaire doit être finement régulée. Ce contrôle passe notamment par la diminution du pouvoir pro-inflammatoire des cytokines sécrétées lors d'une réponse immunitaire. HMGB1, comme d'autres cytokines, voit son activité limitée soit par des processus d'oxydo-réduction soit par l'endocytose de la protéine par les macrophages.

(i) Oxydation

Une fois dans le milieu extérieur, HMGB1 existe sous trois formes : « Tout Thiol », « Bisulfide » ou « Oxydée » ayant des activités différentes. L'apparition des différentes formes est régulée par le degré d'oxydation des cystéines 23, 45 et 106 (**Fig.27**).

1/ La forme « Tout Thiol » est la forme réduite d'HMGB1, elle est responsable du recrutement des cellules immunes au niveau des sites de lésions. Le pouvoir chemoattractant de cette molécule est médié par la formation d'un complexe HMGB1: CXCL12 reconnu par le récepteur de CXCL12 : CXCR4 (Schiraldi et al., 2012). Dans cette configuration HMGB1 à une double fonction : c'est à la fois une cytokine et une chimiokine.

2/ La forme « bisulfide » est la forme responsable des effets pro-inflammatoires d'HMGB1 : la présence de la cystéine 106 dans un état réduit et du pont disulfure entre les cystéines 23 et 45 permet la liaison de HMGB1 au TLR4 et ainsi l'activation des cellules immunitaires innées (Yang et al., 2010, 2011). Dans cette configuration HMGB1 est une cytokine.

3/ La forme « oxydée » est impliquée dans les phénomènes de résolution de l'inflammation : dans cet état, HMGB1 devient inactif (Yang et al., 2011). Dans cette configuration HMGB1 est inerte.

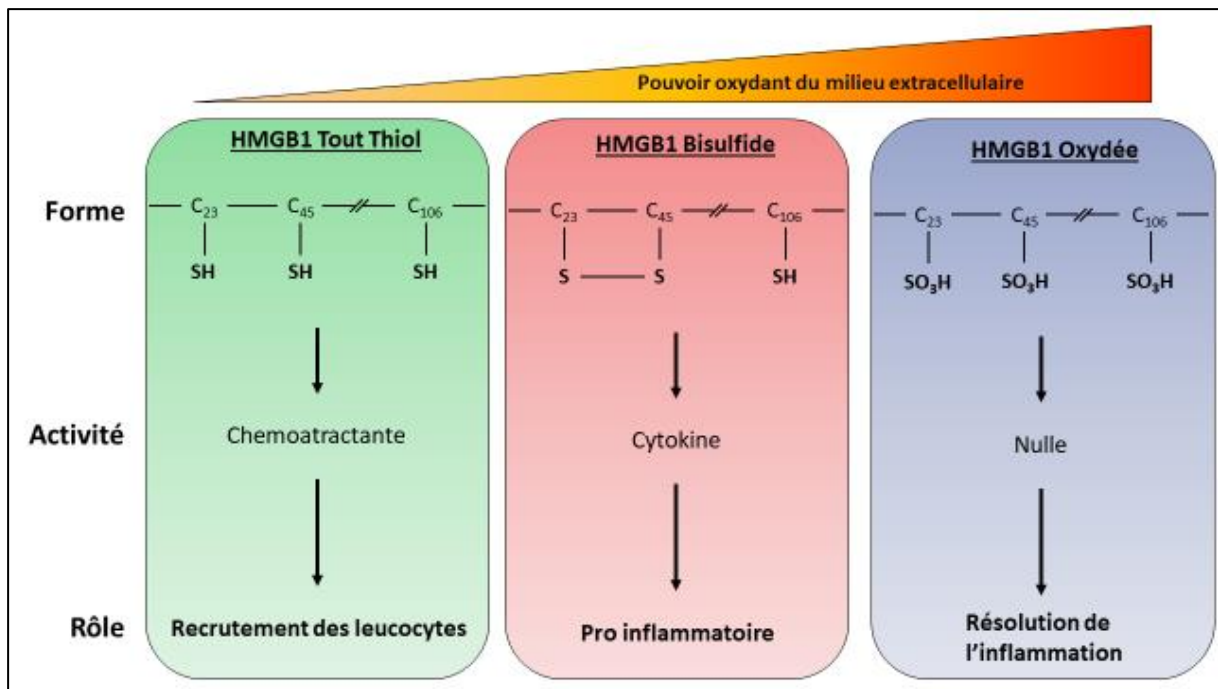


Figure 27 : Contrôle de l'activité d'HMGB1 selon le degré d'oxydo-réduction.

Le pouvoir oxydant du milieu extracellulaire permet de modifier l'activité et le rôle d'HMGB1. La forme tout thiol est chemoattractante et permet le recrutement des leucocytes. La forme bisulfide est une cytokine entraînant une réponse inflammatoire et enfin, la forme oxydée participe à la résolution de l'inflammation. D'après Tang et al. (Tang et al., 2012).

Le degré d'oxydation d'HMGB1 est dépendant de la présence des espèces réactives de l'oxygène (ERO) présentes au niveau du site lésionnel. En effet, au cours de la réponse immunitaire, les cellules immunes sécrètent entre autres choses, des ERO et notamment de l' H_2O_2 ayant un fort pouvoir oxydant. Grâce à ce mécanisme, il existe un phénomène de régulation qui empêche la réaction inflammatoire de perdurer dans le temps et d'éviter la sur-réaction.

(ii) Endocytose

L'endocytose des DAMPs/alarmines est un phénomène permettant de stopper la réponse inflammatoire aigue. Concernant HMGB1, ce phénomène n'a été mis en évidence que récemment. L'endocytose d'HMGB1 est médiée par des récepteurs de type récepteurs scavengers de classe A (SCARA). Les récepteurs SCARA sont des récepteurs exprimés par les macrophages et ayant la capacité d'internaliser un grand nombre de ligands, on parle parfois de récepteurs « éboueurs ». Ce sont des récepteurs extracellulaires organisés en homo trimères. Une fois endocytés les couples HMGB1-Récepteurs sont dirigés vers la voie des lysosomes pour y être dégradés. L'internalisation d'HMGB1 est médiée par trois de récepteurs : SCARA1 (Komai et al., 2017) (ou MSR1, Macrophage scavenger

receptor 1), SACRA2 ou macrophage receptor with collagenous structure (MARCO) (Shichita et al., 2017) et SCARA5 (Guo et al., 2016).

(d) Pharmacologie

Depuis la découverte de ses effets pro-inflammatoires, il apparait clairement qu'HMGB1 est un indicateur précoce de la nécrose cellulaire. Cependant, sa capacité à induire une réponse inflammatoire incontrôlée pouvant conduire à la mort de l'individu a poussé les chercheurs à essayer de développer des composés visant à bloquer ou neutraliser HMGB1. A l'heure actuelle deux grandes stratégies sont mise en place pour diminuer le pouvoir pro-inflammatoire d'HMGB1 : la première approche vise à diminuer l'action Chemotactique/cytokinique d'HMGB1 (1/ ; 2/et 3/), la seconde méthode permet d'inhiber la sécrétion active de la molécule (4/ et 5/) (**Fig 28**).

1/ Lors la découverte du rôle d'HMGB1 comme médiateur tardif de l'endotoxémie, Wang et collaborateurs ont pu mettre en évidence que le traitement de souris avec des anticorps neutralisants HMGB1 améliorait la survie après un choc septique induit par une injection létale de LPS (Wang et al., 1999). Ce résultat suggère donc que l'utilisation d'anticorps neutralisants pourrait être efficace au cours de pathologies inflammatoires aiguës impliquant HMGB1.

L'utilisation d'anticorps (Ac) neutralisants a montré des résultats encourageants au cours de l'overdose de paracétamol. Cet accident médicamenteux est une cause fréquente d'insuffisance hépatique aiguë (Chiew et al., 2018). L'intoxication par cette molécule entraîne une nécrose massive des hépatocytes conduisant à l'augmentation des taux circulants d'HMGB1 (Antoine et al., 2013). Dans un modèle murin d'overdose de paracétamol l'utilisation d'un Ac neutralisant humanisé a permis de diminuer la sévérité des atteintes hépatiques ouvrant ainsi la voie à des thérapies ciblant HMGB1 en clinique humaine (Lundbäck et al., 2016).

L'utilisation d'Ac neutralisant a aussi démontré son efficacité au cours de l'ischémie re-perfusion (I/R). l'I/R hépatique est phénomène courant lors de la transplantation hépatique, la conséquence finale de ce phénomène est l'activation des KC et la mise en place d'une réponse inflammatoire impliquant HMGB1 (Tsung et al., 2005). Dans ce contexte, HMGB1 active les cellules immunitaires innées *via* un mécanisme TLR4 dépendent. L'utilisation des Ac neutralisants HMGB1 dans ce contexte permet aussi de limiter la progression des atteintes hépatiques induite par l'I/R, notamment *via* la diminution drastique de l'infiltrat inflammatoire.

2/ En utilisant une approche à large spectre, Marco Bianchi et son équipe ont mis en évidence que l'acide glycyrrhizique ou glycyrrhizine (GLY), issu de la racine de réglisse (*Glycyrrhiza glabra*), inhibait l'action cytokinique et chimiotactique d'HMGB1 (Mollica et al., 2007). L'interaction entre HMGB1 et la GLY est forte ($K_D \approx 150 \mu\text{M}$). L'utilisation de la résonance magnétique nucléaire a permis de mettre en évidence que la GLY se lie sur HMGB1 au niveau de la box A contenant le site de liaison au TLR4 (Mollica et al., 2007), inhibant l'activité cytokine d'HMGB1.

L'approche pharmacologique basée sur l'utilisation de la GLY présente un avantage majeur : c'est une molécule déjà utilisée en clinique, notamment en Asie pour traiter les hépatites B et C, de plus son coût de production est faible. L'efficacité de ces traitements et le mode d'action de la GLY laissent penser qu'HMGB1 circulant pourrait aussi avoir un rôle dans le développement des hépatites (Sitia et al., 2006).

La GLY présente aussi l'avantage de cibler préférentiellement la forme circulante d'HMGB1, sans modification notable de la mobilité de la forme intracellulaire ni altération de sa fonction nucléaire puisqu'elle ne peut pas franchir la membrane plasmique (Mollica et al., 2007).

3/ L'étude précise des propriétés pro-inflammatoires d'HMGB1 a permis de mettre en évidence le rôle capital de la box B, en effet, ce seul peptide est suffisant pour induire la sécrétion de TNF- α par les macrophages (Li et al., 2003). De façon surprenante, bien que possédant une homologie de 40% avec la box-B, la box-A ne possède pas d'activité cytokinique mais semble être un antagoniste compétitif d'HMGB1 (Yang et al., 2004) en se liant sur le récepteur RAGE (LeBlanc et al., 2014).

In vivo, l'administration de la box-A recombinante améliore la survie des souris au cours d'un choc septique induit par une ligation et ponction du côlon (CLP) (Yang et al., 2004). Au cours de l'arthrite rhumatoïde (AR), une pathologie inflammatoire touchant les articulations et pouvant entraîner à terme une déformation de ces dernières, HMGB1 est retrouvé en abondance dans le liquide synovial suggérant une participation à l'attraction des cellules immunes et à la progression de l'AR (Kokkola et al., 2002). Dans un modèle murin d'AR, le traitement avec la box-A recombinante permet de ralentir la progression de la pathologie (Kokkola et al., 2003).

La seconde méthode repose sur l'utilisation de composés permettant d'empêcher la sécrétion active d'HMGB1 par les macrophages activés.

4/ L'éthyl-pyruvate (EP) est un dérivé du pyruvate possédant un effet anti-inflammatoire dans différents contextes comme la pancréatite aiguë (Yang et al., 2008b), la colite (Davé et al., 2009), le choc septique (Ulloa et al., 2002; Venkataraman et al., 2002), l'ischémie cérébrale (Yu et al., 2005) et

spinale (Wang et al., 2009), l'I/R spinale et myocardique (Woo et al., 2004) ou les lésions cérébrales traumatiques (Su et al., 2011).

L'effet anti-inflammatoire peut s'expliquer par une réduction significative des taux circulants d'HMGB1 lors du traitement à l'EP (Davé et al., 2009; Su et al., 2011; Ulloa et al., 2002; Wang et al., 2009; Yang et al., 2008b). Au cours de ces phénomènes inflammatoires, les cellules immunitaires innées sont activées et pourraient participer à l'augmentation des concentrations plasmatiques d'HMGB1. D'un point de vue mécanistique, l'effet anti-inflammatoire de l'EP pourrait s'expliquer par son effet sur l'acétylation d'HMGB1. En effet, l'EP inhiberait la translocation du noyau vers le cytoplasme en inhibant soit la phosphorylation en chélatant les ions Ca^{2+} indispensables à ce mécanisme (Shin et al., 2015) soit en inhibant l'activité de la déacétylase SIRTUIN1 (Kim et al., 2016b), provoquant la séquestration d'HMGB1 dans le noyau et l'empêchant d'atteindre l'espace extracellulaire (Davé et al., 2009). Cette action a été décrite aussi bien dans des lignées de macrophages que dans des macrophages péritonéaux (Kim et al., 2016b; Shin et al., 2015). Cependant, l'EP n'est à priori pas un inhibiteur spécifique de la sécrétion active des macrophages comme trop souvent décrit de façon erronée dans la littérature, il est un inhibiteur de la sécrétion active au sens large, en effet, d'autres cellules douées de la capacité de sécréter HMGB1 de façon active sont sensibles à l'action de l'EP, tels que les adipocytes (Nativel et al., 2013).

5/ Récemment, une nouvelle classe de composés pharmacologiques a été identifiée comme pouvant inhiber la sécrétion d'HMGB1 dans un contexte d'I/R cérébrale (Lee et al., 2014) ou de septicémie (Cho et al., 2017). La sécrétion d'HMGB1 est étroitement liée à des modifications post-traductionnelles notamment la phosphorylation de résidus sérines (Youn and Shin, 2006) ainsi que l'acétylation de lysines (Kim et al., 2016a). Les ICM sont capables de rentrer dans la cellule et d'inhiber ces modifications post-traductionnelles en se liant directement sur HMGB1 (Lee et al., 2014). Dans ces deux contextes, l'inhibition de la sécrétion active d'HMGB1 permet de diminuer la sévérité des atteintes (I/R cérébrale) et d'augmenter significativement la survie des animaux (septicémie). Cependant, l'effet des ICM pourraient favoriser la dégradation de Beclin1 et ainsi diminuer l'autophagie (Kim et al., 2018), dans ce contexte, les ICM pourraient être utilisés dans des pathologies liées à un excès d'autophagie, comme la maladie de Pompe (Raben et al., 2009) mais aussi dans le cas de maladies inflammatoires.

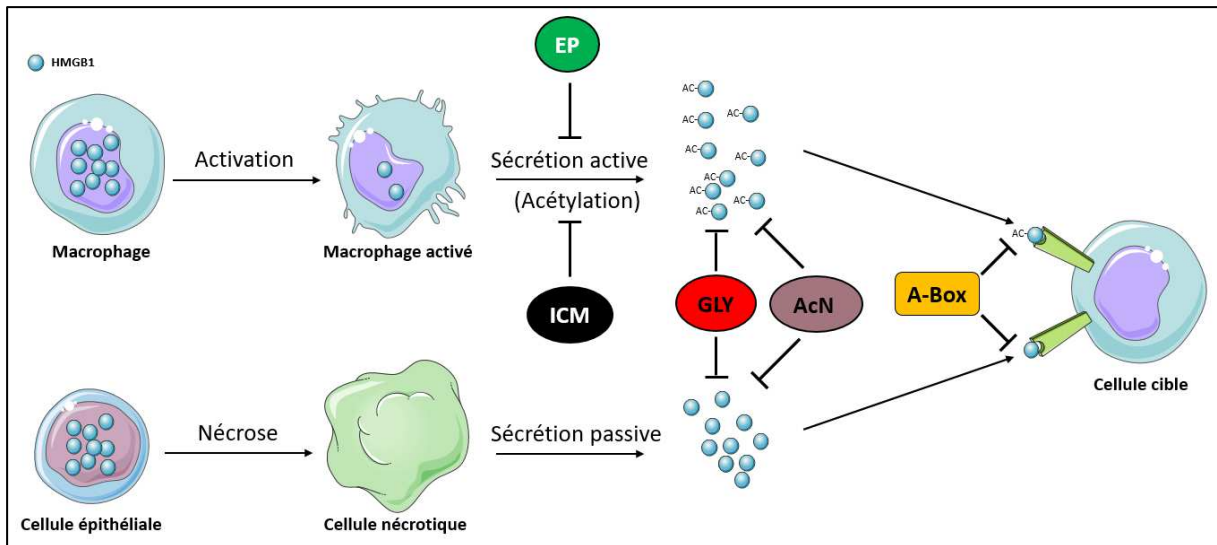


Figure 28 : Bilan des stratégies pharmacologiques ciblant HMGB1.

HMGB1 circulant peut provenir de deux sources : soit d'une sécrétion active par les macrophages activés soit sécrété passivement par une cellule épithéliale, par exemple, lors d'un épisode nécrotique. La sécrétion active d'HMGB1 se fait suite à une acétylation (Ac-HMGB1) de la protéine, l'éthyl-pyruvate (EP) et les inflachromènes (ICM) inhibent cette modification post-traductionnelle. Une fois dans l'espace extracellulaire et ce quelle que soit la source, HMGB1 va pouvoir exercer une activité chimiokine ou cytokine. L'utilisation de la glycyrrhizine (GLY) ou d'anticorps neutralisants (AcN) permet de limiter l'activité chimiokine. L'action cytokinique d'HMGB1 passe par la liaison de la protéine sur des récepteurs de l'immunité innée portés par les cellules cibles. L'utilisation de A-box recombinantes permet de limiter cette liaison.

II. Objectifs de la thèse

Comme évoqué en introduction, la stéatose hépatique constitue la porte d'entrée d'une cascade pathologique pouvant conduire au développement d'une cirrhose et éventuellement d'un CHC, pour lequel il n'y a pas, actuellement, de traitement efficace. Face au manque de thérapies efficaces, il est donc nécessaire d'identifier les mécanismes favorisant la progression de cette cascade pathologique afin d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques.

Parmi les causes susceptibles d'engendrer le développement de la stéatose hépatique, un déséquilibre dans la balance stockage (l'activité de la *LDN*) et utilisation (β -oxydation) des lipides est assez fréquent (Geisler and Renquist, 2017). L'expression des enzymes impliquées dans ces cascades biochimiques sont finement régulées par un certain nombre de facteurs de transcription parmi lesquels ChREBP, SREBP1c ou PPAR γ pour la *LDN* et principalement PPAR α pour la β -oxydation. L'activité de ces facteurs de transcription est régulée par des modifications post-traductionnelles (phosphorylation, acétylation par exemple) mais aussi par la capacité de ces protéines à atteindre leurs éléments de réponse au niveau de la chromatine. Ainsi, l'accessibilité des éléments de réponse dépend directement de l'état de compaction de la chromatine, régulée par de très nombreux facteurs nucléaires comme les histones mais aussi par les protéines HMG, dont HMGB1, qui est, après les histones, la protéine la plus abondante dans le noyau (Müller et al., 2004).

Il est de plus très intéressant de noter qu'HMGB1 semble jouer un rôle clef dans le métabolisme hépatique puisqu'en effet, la létalité périnatale de son KO global serait due à une hypoglycémie, liée à une mauvaise dégradation des stocks hépatiques de glycogène dans les 24 heures qui suivent la naissance des souriceaux (Calogero et al., 1999).

Des résultats non publiés du laboratoire ont montré que, dans un modèle murin de stéatose liée à la progression de l'obésité, l'expression génique (**Fig 29A**) et les taux protéiques (**Fig 29B**) hépatiques d'HMGB1 sont significativement augmentés renforçant ainsi le lien entre HMGB1 et le métabolisme hépatique.

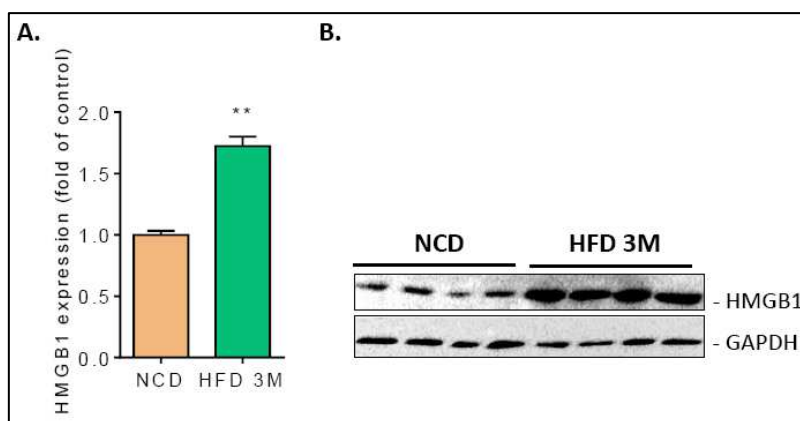


Figure 29 : Evolution de l'expression génique et protéique d'HMGB1 au cours de la stéatose.

Après trois mois de régime HFD60% l'expression génique (A.) et protéique d'HMGB1 (B.) est significativement augmentée.

De plus, des résultats préliminaires du laboratoire ont montré que, chez la souris, les niveaux circulants d'HMGB1 sont augmentés au cours d'un stress métabolique induit par différentes approches nutritionnelles (de 10ng/mL en chow diet à 15-25ng/mL en HFD ou choline déficient diet, respectivement, **Fig 30**).

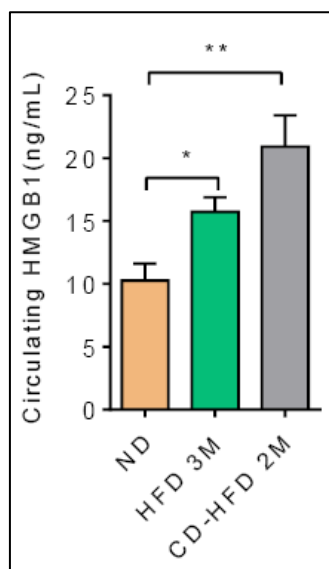


Figure 30 : Evolution des concentrations plasmatiques d'HMGB1 lors d'un stress métabolique.

Après trois mois de HFD60% (HFD 3M), comme après deux mois de régime déficient en choline (CD-HFD 2M), les concentrations circulantes d'HMGB1 sont significativement augmentées par rapport au contrôle normal diet (ND).

Des études chez des sujets obèses et diabétiques rapportent une augmentation des concentrations circulantes d'HMGB1 aussi bien chez l'enfant (Arrigo et al., 2013) que chez l'adulte (Guzmán-Ruiz et al., 2014; Wang et al., 2015a). Dans un contexte d'inflammation de bas bruit, et en considérant son

pouvoir pro-inflammatoire, HMGB1 circulant pourrait réguler l'inflammation et les altérations métaboliques, comme la stéatose hépatique, générées par la progression de l'obésité. En effet, au cours d'un stress métabolique généré par un régime high fat court (deux semaines), l'inhibition de la forme circulante d'HMGB1 diminue l'infiltration des cellules immunes dans le foie (**Fig 31A**) et le tissu adipeux (**Fig 31C**), permet une réduction de la fibrose du foie (**Fig 31B**) et du tissu adipeux (**Fig 31D**), ainsi qu'une diminution significative de la stéatose (**Fig 31E**). Ainsi, l'inhibition d'HMGB1 a un effet significatif sur l'inflammation des tissus métaboliques et prévient la progression de la stéatose.

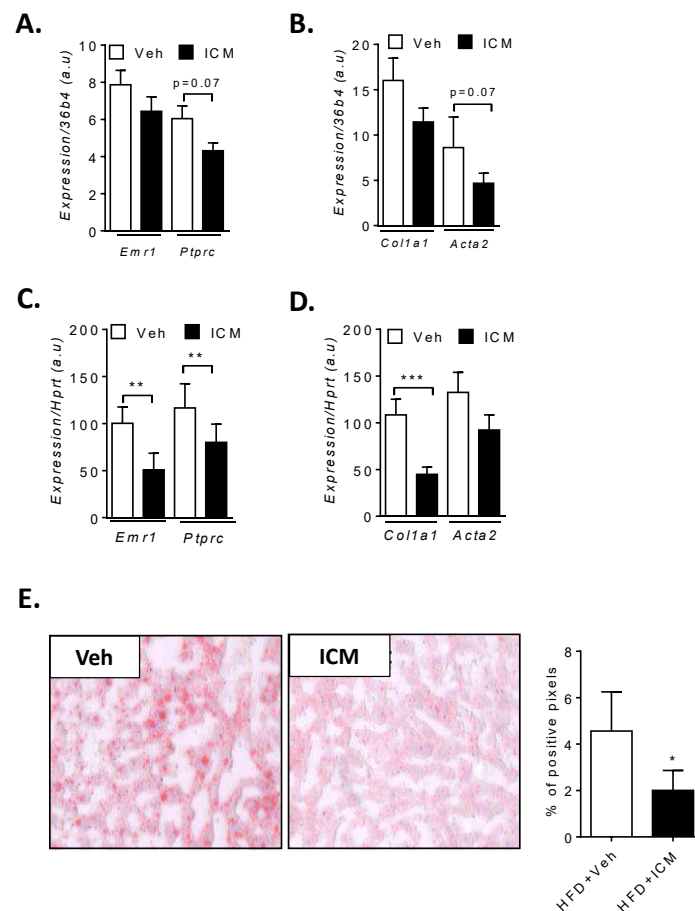


Figure 31 : Un traitement court avec inhibiteur de la sécrétion d'HMGB1 limite les conséquences d'un stress métabolique. Au cours d'un stress métabolique induit par un régime HFD60% de 2 semaines les animaux reçoivent soit le véhicule (Veh, n=10) soit un inhibiteur de la sécrétion d'HMGB1 (ICM, n=10). A la fin du traitement, l'expression génique des marqueurs de l'inflammation *Emr1* et *Ptprc* et de la fibrose *Col1a1* et *Acta2* est mesurée par qPCR dans le foie (A et B) et dans le tissu adipeux (C et D). La stéatose hépatique est quantifiée par un marquage à l'huile rouge (E).

Tous ces résultats pris ensemble établissent un lien fort entre HMGB1, la physiologie hépatique et le métabolisme énergétique. Mais sur la base de ces résultats encourageants, plusieurs questions restent en suspens pour comprendre la biologie et le rôle fonctionnel d'HMGB1 dans l'hépatocyte et dans le sang au cours du stress métabolique.

Dans ce contexte, ce travail de thèse a trois objectifs principaux :

OBJECTIF I : Etude du rôle d’HMGB1 dans les hépatocytes au cours de la progression de la stéatose :

Dans le but d’étudier le rôle d’HMGB1 dans la physiologie hépatique et le métabolisme énergétique *in vivo*, et compte tenu de la létalité du KO global de la protéine, nous avons généré un modèle murin présentant une délétion du gène *Hmgb1* spécifiquement dans les hépatocytes (HMGB1^{ΔHep}). Les souris contrôles HMGB1^{fl/fl} et HMGB1^{ΔHep} sont soumises à différentes modulations nutritionnelles afin de mieux caractériser l’impact de la délétion d’HMGB1 sur la physiologie du foie.

OBJECTIF II : Etude du rôle biologique de la forme circulante d’HMGB1 au cours du stress métabolique :

Au cours du stress métabolique le rôle d’HMGB1 circulant est mal caractérisé et peu connu. Pour comprendre l’effet de cette molécule dans ce contexte nous avons mis en place des approches pharmacologiques reposant sur l’utilisation de deux inhibiteurs soit de l’activité cytokinique (la GLY) soit de la sécrétion active (les ICM) d’HMGB1 dans un contexte de stress métabolique. Comme décrit précédemment, un traitement par les ICM au cours d’un stress métabolique très court (**Fig 31**) a entraîné une diminution très encourageante des marqueurs inflammatoires dans le foie et le tissu adipeux. Pour aller plus loin dans cette caractérisation nous avons donc lancé plusieurs protocoles expérimentaux où des souris sauvages, sous régime hyper-lipidique, seront traitées avec ces deux inhibiteurs (ICM et GLY).

OBJECTIF III : Etude de la source tissulaire à l’origine de la forme circulante d’HMGB1 :

Comme déjà évoqué, au cours de la progression de l’obésité les concentrations circulantes d’HMGB1 sont augmentées chez la souris obèse mais aussi chez le patient obèse (Arrigo et al., 2013; Guzmán-Ruiz et al., 2014; Wang et al., 2015a). A l’heure actuelle le(s) tissu(s) impliqué(s) dans la production de ces taux circulants et dans l’augmentation observée au cours du stress métabolique sont inconnus. Compte tenu de l’inflammation de bas grade décrite, et du stress subi par les tissus métaboliquement actifs au cours de la progression de l’obésité, nous posons l’hypothèse que l’augmentation des taux circulants d’HMGB1 pourrait provenir des cellules les plus exposées au stress métabolique soit des hépatocytes, des adipocytes ou des macrophages. Pour étudier la contribution relative de ces types cellulaires dans les taux circulants d’HMGB1, nous avons mis en place des approches de délétions cellule-spécifique d’HMGB1 en utilisant la technologie CRE-Lox dans chacun de ces types cellulaires générant ainsi les lignées délétées spécifiquement dans les hépatocytes : HMGB1^{ΔHep}, les adipocytes HMGB1^{ΔAdipo}, et les macrophages HMGB1^{ΔMac}.

III. Résultats

A. Objectif I : HMGB1 est un régulateur de la lipogenèse *de novo* hépatique

1. Matériel et méthodes

Animaux : Le protocole a été réalisé en accord avec la charte éthique de l'INSERM (US006 CREFRE-CEEA-122, 1710480320). Les souris KO-hépatocyte spécifique pour HMGB1 (HMGB1^{Δhep}) sont identiques à celles utilisées par Huebener, Pradère et collaborateurs (Huebener et al., 2014).

Approches nutritionnelles et pharmacologiques : Obésité induite par l'alimentation : Les souris sont nourries soit avec un régime standard (NCD, Research Diet) soit avec un régime hyper-lipidique contenant 60% (HFD60%, Research Diet) de calories sous forme de lipides pendant 12 ou 20 semaines. Fibrose hépatique induite par l'alimentation : Les souris sont nourries soit avec un régime standard (NCD) soit avec un régime déficient en choline dans lequel 60% des calories sont apportées par les lipides (CD-HFD60%, Research Diet) soit avec un régime déficient en choline dans lequel 45% des calories sont apportées par les lipides (CD-HFD45%, Research Diet). Fasting-Refeeding : les souris en NCD (Research Diet) sont mises à jeun à ZT14 (22h00) puis re-nourries à ZT20 (03h00) avec le régime NCD ainsi que 20% de glucose dans l'eau de boisson pendant 8 heures. Traitement aigu à la rosiglitazone (rosi) : les animaux reçoivent une injection aigue de 25mg/kg de rosi (agoniste PPAR γ) en i.v. vers 19h00, et 18 heures après l'injection les animaux sont euthanasiés. Lors du sacrifice, les tissus sont récupérés, pesés, congelés dans l'azote liquide puis stockés à -80°C jusqu'à utilisation. Mesure de corps cétoniques : Les corps cétoniques sont mesurés par prélèvement sanguin à la veine caudale (lecteur de corps cétoniques FreeStyle Optium Neo, Abbot).

Tests de tolérance : Test de tolérance oral au glucose (OGTT) : après un jeûne overnight (18h00-8h00) les souris sont gavées avec une solution de glucose. La dose administrée est de 1,5g de glucose par kg de poids corporel. L'évolution de la glycémie est suivie par prélèvement sanguin au niveau de la veine caudale (Glucomètre Accu-Chek, Roche). Test de tolérance au pyruvate (PTT) : après un jeûne de 6h, les souris reçoivent en i.p. une injection de 1,5g par kg de pyruvate (Sigma), comme précédemment, l'évolution de la glycémie est suivie par prélèvement sanguin au niveau de la veine caudale (Glucomètre Accu-Chek, Roche®).

Mesure *in vivo* de la LDN : Les animaux sont mis à jeun à ZT14, 6 heures après (ZT 20) les animaux reçoivent un bolus de glucose tritié (0,4 μ Ci/g) et de glucose « froid » (2mg/g) en intra-péritonéal (i.p.). Une heure après, les animaux sont sacrifiés et le foie, les tissus adipeux sous cutané, péri-gonadique et brun sont récoltés puis congelés dans l'azote liquide. Les fractions lipidiques de différents tissus sont extraites en utilisant la méthode de Folch. Puis la radioactivité est mesurée en utilisant un compteur à scintillation (Perkin-Elmer).

Mesure de la masse grasse et de la masse maigre : Les mesures des taux de masse grasse et de masse maigre ont été effectuées par imagerie par résonance magnétique (EchoMRI-100TM 3 en 1TM). Les résultats ont été exprimés en pourcentage de masse grasse et maigre rapporté au poids de la souris.

Exports de VLDL : Après une mise à jeun de 5 heures suivie par une injection i.v. de tyloxapol 10% à 500mg/kg, le sang est collecté toutes les heures puis les TG plasmatiques sont quantifiés.

Calorimétrie indirecte : Les différents paramètres sont analysés par le système PhenoMaster (TSE systems).

Quantification des lipides neutres : 50mg de foie sont homogénéisés dans 1mL d'eau : méthanol (1 :2 volumes), EGTA (5mM). Les lipides sont extraits avec un mélange méthanol : chloroforme : eau (2,5 :2,5 :1,7 volumes), purifiés avec une colonne SPE, desséchés puis solubilisés dans de l'acétate d'éthyle. La fraction obtenue est analysée par chromatographie gazeuse.

Isolation des hépatocytes : Les hépatocytes de souris en NCD ou HFD sont isolés comme décrit par Fortier et collaborateurs (Fortier et al., 2017). Brièvement, les foies sont perfusés par la veine cave inférieure par une solution d'EGTA puis par une solution contenant de la collagénase (Sigma). Les hépatocytes sont ensuiteensemencés sur des plaques coatées au collagène de type I (Rat tail type I collagen).

Chromatine immuno-précipitation couplée au séquençage (ChIP-seq): Les ChIP sont réalisées comme décrit par Iacovoni *et al.* (Iacovoni et al., 2010) en utilisant un anticorps anti HMGB1 (Abcam). Le séquençage est réalisé par la plateforme de l'EMBL (Allemagne).

Mesure de l'activité de la LDN *ex vivo* : Les hépatocytes sont déprivés en sérum 3 heures puis incubés avec du ¹⁴C-acétate pendant 3 heures en présence ou non d'insuline puis la fraction lipidique est

extraite en utilisant la méthode de Folch et la radioactivité est mesurée par scintillation (Perkin-Elmer). Toutes les mesures sont réalisées en triplicats techniques et les valeurs sont normalisées par la quantité de protéines.

Mesure de la β -oxydation *ex vivo* : Les hépatocytes sont incubés pendant 18h avec du ^{14}C -palmitate ($1\mu\text{Ci}/\text{mL}$) et du palmitate froid ($80\mu\text{M}$) pour marquer le pool endogène de TG. A l'issue de cette incubation, l'oxydation des AG est calculée par la somme du $^{14}\text{CO}_2$ et du ^{14}C -ASM (acid soluble metabolites) mesurée par scintillation (Perkin-Elmer). Toutes les mesures sont réalisées en triplicats techniques et les valeurs sont normalisées par la quantité de protéines.

Mesure de l'activité MTTP : L'activité de la MTTP est quantifiée en utilisant le kit MTTP activity assay (Sigma) conformément aux instructions du fabricant.

Microarray : Les profils d'expression des gènes ont été réalisés par la plateforme GeT-TRiX (GénoToul, Génopole Toulouse) à l'aide des puces Agilent Sureprint G3 Mouse GE v2 (8x60K, design 074809) en suivant les instructions du fabricant. Pour chaque échantillon, l'ARNc marqué à la cyanine-3 (Cy3) a été préparé à partir de 200 ng d'ARN total en utilisant le kit One-Color Quick Amp Labeling (Agilent) selon les instructions du fabricant, puis le kit Agencourt RNAClean XP (Agencourt Bioscience Corporation, Beverly, Massachusetts). L'incorporation de la sonde et le rendement d'ARNc ont été vérifiés en utilisant un lecteur Dropsense™ 96 UV/VIS (Trinean, Belgique). 600 ng d'ARNc marqués à la Cy3 ont été hybridés sur les lames de microarray en suivant les instructions du fabricant. Immédiatement après le lavage, les lames sont scannées par un scanner de puces à ADN Agilent G2505C en utilisant le logiciel Agilent Scan Control A.8.5.1, et le signal de fluorescence est extrait en utilisant le logiciel Agilent Feature Extraction v10.10.1.1 avec les paramètres par défaut. Les données de puces à ADN ont été analysées en utilisant R (R Development Core Team, 2008) et le package Bioconductor (www.bioconductor.org, v 3.0). Les données brutes (intensité du signal médian) ont été filtrées, transformées (\log_2) et normalisées en utilisant la méthode du quantile. Le modèle a été ajusté en utilisant la fonction `limm lmFit`. Des comparaisons par paires entre les conditions biologiques ont été appliquées en utilisant des contrastes spécifiques. Une correction pour des tests multiples a été appliquée en utilisant la procédure de Benjamini-Hochberg pour le False Discovery Rate (FDR). Les sondes avec $\text{FDR} \leq 0,05$ ont été considérées différentiellement exprimées entre les conditions. La classification hiérarchique a été appliquée aux échantillons et aux sondes différentiellement exprimées en utilisant le coefficient de corrélation de Pearson comme distance et le critère de Ward pour l'agglomération. Les résultats de la classification sont illustrés sous la forme d'une carte thermique des

signaux d'expression. L'enrichissement des processus biologiques Gene Ontology (GO) a été évalué à l'aide d'un test hypergéométrique conditionnel (package GOSTATS). L'analyse des fonctions et des réseaux est réalisée en utilisant le logiciel Ingenuity Pathway Analysis (IPA, Qiagen).

Histologie : Inclusion et coupes : Les inclusions en paraffine et les coupes (5µm) sont réalisées par le plateau histologie de l'I2MC. Pour les cryo-sections, les échantillons sont sortis de la formaline après 24h et transférés dans une solution de sucrose 30%. Après 72h les échantillons sont inclus dans l'OCT puis congelés à -80°C. **Colorations** : Brièvement, les lames blanches déparaffinées sont colorées avec du Rouge Sirius (1% de Rouge Sirius dilué dans de l'acide picrique) pendant 1h30 ou colorées à l'acide périodique de Schiff. Les lames sont ensuite montées avec la colle Eukitt. Les cryo-coupes sont incubées dans de l'isopropanol 60% avec coloration dans l'huile rouge ou Oil-Red-O (solution de 0,5% dans de l'isopropanol) pendant 15 minutes. Les lames sont ensuite montées en milieu aqueux. **Numérisation et quantification** : Les lames sont numérisées grâce au scanner Nanozoomer du fabricant Hamamatsu. L'analyse d'image et la quantification sont réalisées en utilisant le logiciel Photoshop®.

Dosages biochimiques plasmatiques : Le sang a été prélevé dans la veine cave lors du sacrifice. Le plasma a été obtenu par une centrifugation 5 minutes; 4 °C; 8000 rpm. Les dosages des transaminases (ALT pour ALanine aminoTransférase, AST pour ASpartate aminoTransférase) ont été effectués en collaboration avec la plateforme Anexplo/Genotoul de Toulouse (<http://anexplo.genotoul.fr/>).

Expression Génique par RT-PCR en temps réel : Extraction des ARN sur colonne: les tissus sont broyés (Precellys™, Bertin Technologies) avec 1mL de Qiazol. Les lysats sont ensuite délipidés par ajout de 200µl de chloroforme et centrifugation (15 min, 4°C, 4000 rpm). La phase aqueuse est transférée dans l'éthanol absolu (350µL). Les échantillons (700µL) sont ensuite transférés sur colonnes. Après les différentes étapes décrites dans le protocole du kit et traitement à la DNase pendant 10 minutes. Les ARN en solution aqueuse sont dosés par spectrophométrie (Xpose™, Trinean®). **Reverse transcription et qPCR** : (kit «High Capacity cDNA reverse transcription » (Applied Biosystem®)). La RT est réalisée selon les consignes du fabricant à partir de 500 ng d'ARN. Lors de la qPCR, les ADNc sont mis en présence des amorces sens et anti-sens (Eurogentec®) diluées à leurs concentrations optimales. **qPCR à moyen débit (Fluidigm)** : L'expérience est réalisée conformément aux instructions du fabricant en collaboration avec le plateau GetTQ (Genotoul). Les données sont analysées en collaboration avec la plateforme de bioinformatique de l'institut (J.Iacovoni). Les heat maps générées représentent l'expression des gènes sélectionnés sur la base de la p value calculée par Lima biopackage (R).

Western Blotting : Préparation des échantillons : Les tissus sont broyés à 4°C (Precellys®, Bertin Technologies) dans 1mL de tampon RIPA additionné d'anti-protéase et anti-phosphatase (1/100). Le broyat est ensuite délipidé par centrifugations successives (5000rpm, 10min 4°C). Electrophorèse : Les échantillons sont déposés sur un gel de polyacrylamide pré-coulé (BioRad®). Un courant de 100V est ensuite appliqué. Transfert et immunomarquage : les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose par le système de transfert semi-sec Trans-blot (BioRad®). Puis l'hybridation avec les anticorps primaires se fait à 4°C pendant la nuit. La détection se fait par l'émission de la chimiluminescence capturée par le ChemiDoc (BioRad®) puis quantifiée grâce au logiciel ImageLab. Les images montées sont représentatives

Statistiques : Les résultats sont exprimés sous la forme de moyenne accompagnée de l'erreur standard à la moyenne. La différence statistique des résultats est déterminée en utilisant un test de Mann-Whitney ou d'une two-way ANOVA. Le niveau de significativité choisie est p value <0.05 (*), p value <0.01 (**) et p value <0.001 (***).

2. Résultats

Rôle d'HMGB1 dans le fonctionnement hépatique basal :

Dans le but de caractériser *in vivo* le rôle de la protéine HMGB1 dans l'hépatocyte, nous avons généré une lignée de souris présentant une délétion hépato-spécifique du gène *Hmgb1* (HMGB1^{Δhep}) en croisant des souris *Hmgb1* floxé entre les exons 2,3 et 4 (HMGB^{fl/fl}) avec des souris exprimant la recombinase CRE sous le contrôle du promoteur de l'albumine (Postic et al., 1999).

A l'état basal, les souris HMGB1^{Δhep} présentent une réduction de l'expression protéique d'HMGB1 de 80% (**Fig 32A, gauche**), comme déjà décrit par Huebener et Pradère (Huebener et al., 2014) sans modification de la concentration circulante mesurée par test ELISA (**Fig 32A, droite**). La délétion d'HMGB1 n'entraîne pas non plus de modification du poids du foie ni de la composition corporelle (**Fig 32B**). L'absence de cette protéine n'entraîne pas d'augmentation de la quantité des transaminases alanine aminotransférase (ALT) et aspartate aminotransférase (AST) circulantes (**Fig 32C**). Comme attendu suite aux résultats précédents, la tolérance au glucose des animaux HMGB1^{Δhep} est strictement comparable à celle des animaux HMGB1^{fl/fl} (**Fig 32D**). La quantification des espèces lipidiques (triglycérides (TG), diglycérides (DG), cholestérol (Chl) et ester de cholestérol (CE)) contenues dans le foie des animaux HMGB1^{Δhep} ne montre pas de différence qualitative ou quantitative comparativement aux animaux contrôles HMGB1^{fl/fl} (**Fig 32E**). De même, l'activité de synthèse et l'activité de sécrétion des VLDL ne sont pas perturbées dans le foie des animaux HMGB1^{Δhep} comparativement aux animaux contrôles (**Fig 32F et 32G** respectivement). Pris tous ensemble ces résultats suggèrent que la présence d'HMGB1 n'est pas requise pour la fonction métabolique du foie à l'état basal.

Cependant, l'étude du transcriptome hépatique par qPCR à moyen débit (**Fig 32H**) montre que, comparativement aux animaux contrôles, les animaux HMGB1^{Δhep} présentent une augmentation significative de l'expression de marqueurs géniques classiquement décrits comme étant impliqués dans le développement de la fibrose comme les collagènes 1, 3 et 4 (*Col1a1*, *Col3a1* et *Col4a1* respectivement), le facteur de croissance des tissus conjonctifs *Ctgf* ou le transforming growth factor- β (*Tgfb1*). L'étude du profil d'expression génique montre aussi que la délétion d'HMGB1 augmente l'expression de *Pnpla3*, *Fasn*, *Cd36* ou *Pparg*.

Ainsi tous ces résultats semblent indiquer que la délétion d'HMGB1 n'a pas d'effet marqué sur le fonctionnement hépatique mais pourrait favoriser le développement de la NASH et/ou de la stéatose hépatique.

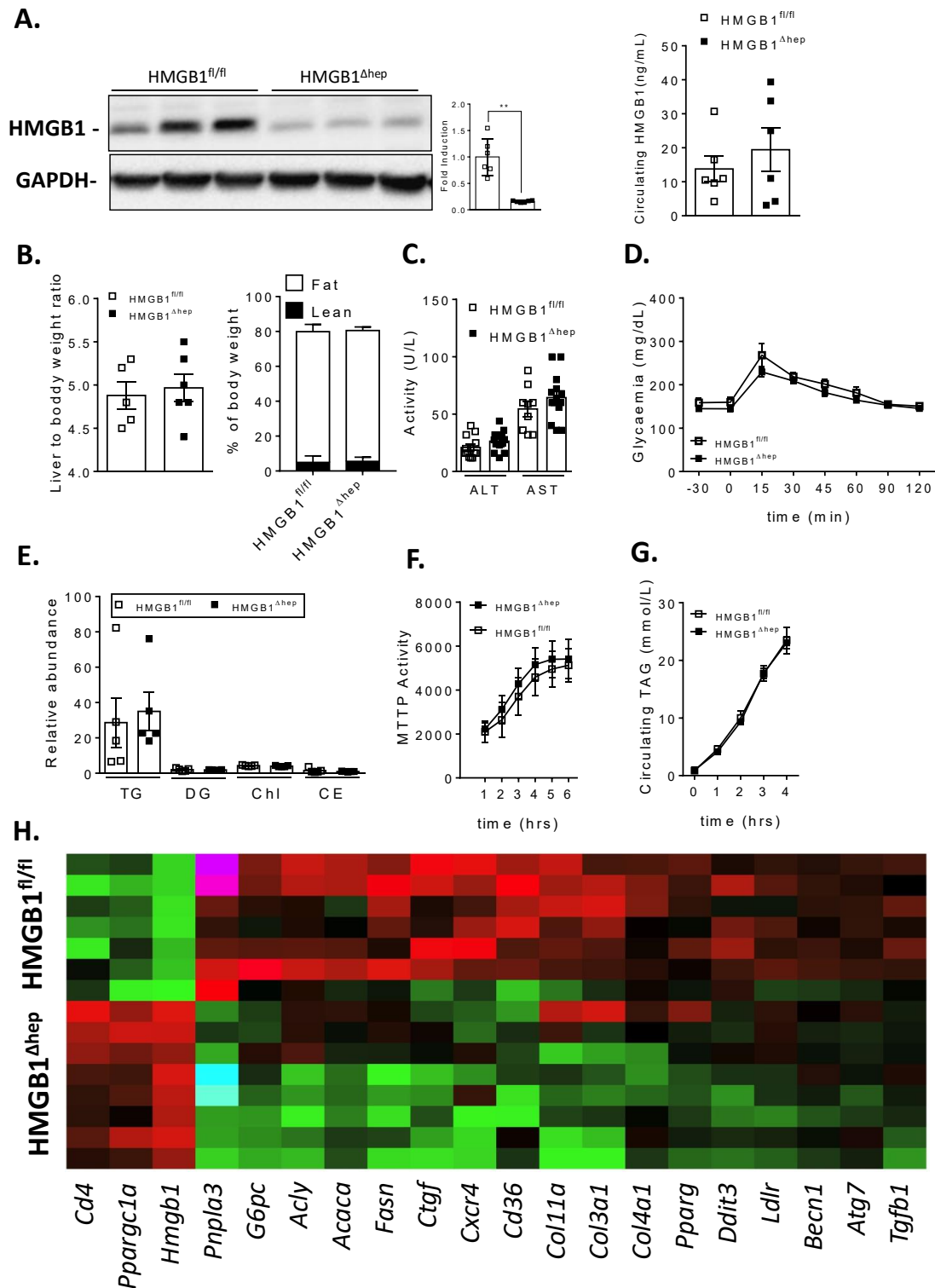


Figure 32 : A l'état basal la délétion d'HMGB1 dans les hépatocytes n'a aucun effet mais pourrait favoriser la progression de la fibrose et/ou de la stéatose.

En basal, la délétion d'HMGB1 hépatique et les taux circulants d'HMGB1 (A) ainsi que le ratio poids de foie/poids de corps et la composition corporelle (B) sont mesurés chez des animaux sauvages (HMGB1^{fl/fl}, n=8) et des animaux délétés pour Hmgb1 dans les hépatocytes (HMGB1^{Δhep}, n=8). Les souris sont soumises à une OGTT (D). Les espèces lipidiques hépatiques sont quantifiées par chromatographie gazeuse (E). La synthèse ex-vivo (F) et la sécrétion in-vivo (G) des VLDL sont mesurées. L'expression génique est analysée par qPCR à moyen débit (H). Données exprimées en moyenne ± ESM, **p<0.01.

Effet de la délétion d'HMGB1 au cours de la progression de la NASH :

Afin de vérifier si cette signature génique « pro-fibrotique » sensibilise les souris HMGB1^{Δhep} comparativement aux souris HMGB1^{fl/fl} au développement d'un NASH, nous avons mis en place deux approches nutritionnelles complémentaires.

La première approche repose sur l'utilisation d'un régime déficient en choline (CD) comportant 60% de lipides (CD-HFD60%) comparativement au régime de référence, le MCDD, cette approche permet de limiter la perte de poids induite par un régime déficient de méthionine. Comme classiquement décrit dans la littérature, ce régime n'induit pas de prise de poids comparativement au régime contrôle (NCD), là aussi, aucune différence n'est observée entre les deux génotypes (**Fig 33A**). De façon inattendue, des animaux HMGB1^{Δhep} présentent une augmentation significative ($p=0,041$) du ratio poids du foie sur poids du corps comparativement aux animaux contrôles HMGB1^{fl/fl} (**Fig 33B**). En revanche, cette augmentation du ratio n'est pas associée à une augmentation de la fibrose quantifiée par un marquage au rouge Sirius (**Fig 33C**). L'expression génique de marqueurs de la fibrose *Col1a1*, *Col3a1* ou *Acta1* ainsi que de l'inflammation (*Adgre1*, *Ptprc* et *Tnf*) ne révèle aucune différence entre les deux génotypes (**Fig 33D**). Ces résultats suggèrent que, dans un contexte de fibrose sans obésité ni altérations du métabolisme glucidique, la délétion hépatocyte-spécifique d'HMGB1 n'a aucun impact sur la progression de la fibrose et de l'inflammation.

La seconde approche utilise un régime CD comportant 45% de lipides, cette approche permet de combiner une fibrose hépatique avec une gluco-intolérance et une prise de poids. Comme déjà décrit dans la littérature, ce régime induit une prise de poids significative ($p>0.001$) comparativement au régime contrôle (NCD), ici aussi, la délétion d'HMGB1 ne modifie ni la prise de poids comparativement aux souris HMGB1^{fl/fl} (**Fig 33E**), ni la tolérance au glucose mesurée au cours d'un test de tolérance au glucose (données non montées). Contrairement au CD-HFD60%, le CD-HFD45% n'induit pas de modification significative du ratio poids de foie-poids de corps (**Fig 33F**). Dans ce contexte, la délétion d'HMGB1 ne modifie ni la progression de la fibrose (**Fig 33G**) ni l'expression génique de marqueurs classiques de la fibrose comme *Col1a1*, *Col3a1* ou *Acta1* (**Fig 33H, gauche**). Les animaux HMGB1^{Δhep} présentent une augmentation significative de l'expression du *Tnf* ($p=0.071$) alors que l'expression des autres marqueurs reste inchangée (**Fig 33H, droite**). Ces résultats suggèrent que dans un contexte alliant obésité, altération du métabolisme glucidique, fibrose et stéatose hépatique, la délétion d'HMGB1 n'a qu'un impact très limité sur la progression de la fibrose et de l'inflammation. Pris tous ensemble, ces résultats basés sur deux modulations nutritionnelles complémentaires suggèrent de façon surprenante, qu'HMGB1 hépatocytaire n'a qu'un rôle extrêmement limité dans la progression fibro-inflammatoire décrite au cours de la NASH.

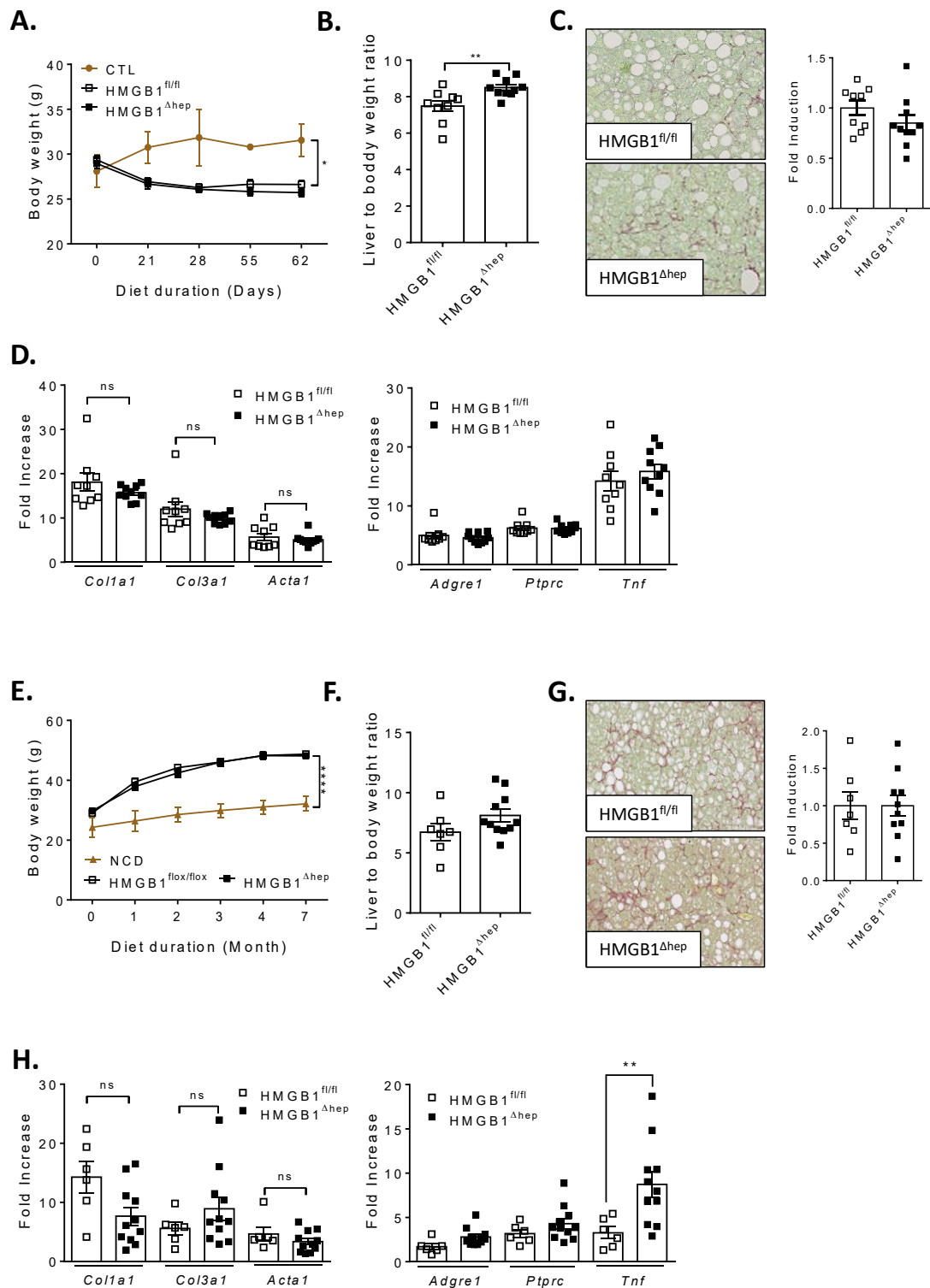


Figure 33 : La délétion d'HMGB1 hépatocytaire ne favorise pas la progression de la fibrose hépatique induite par un régime CD.

Après régime CD-HFD60% de 8 semaines, la prise de poids (A) et le ratio poids de foie/poids de corps (B) sont mesurés chez les animaux HMGB1^{fl/fl} (n=9) et HMGB1^{Δhep} (n=10). La fibrose est mesurée par un marquage au rouge sirius (C). L'expression de marqueurs de la fibrose (Col1a1, Col3a1 et Acta1) et de l'inflammation (Adgre, Ptpcr et Tnf) est mesurée par qPCR (D). Après un régime CD-HFD45% la prise de poids (E) et le ratio poids de foie/poids de corps (F) sont mesurés chez les animaux HMGB1^{fl/fl} (n=7) et HMGB1^{Δhep} (n=11). La fibrose est mesurée par un marquage au rouge sirius (G). L'expression de marqueurs de la fibrose (Col1a1, Col3a1 et Acta1) et de l'inflammation (Adgre, Ptpcr et Tnf) est mesurée par qPCR (H). Données exprimées en moyenne ± ESM, *p<0.05, **p<0.01, ****p<0.0001.

Effet de la délétion d'HMGB1 hépatocytaire dans la progression de la stéatose :

Afin d'induire le développement d'une stéatose hépatique, les souris sont nourries avec un régime hyper lipidique contenant 60% de lipides (HFD60%) pendant 12 semaines. Dans ce contexte, la délétion d'HMGB1 ne modifie pas la prise de poids au cours de ce régime, ni la tolérance au glucose mesurée lors d'un OGTT (Données non montrées). Le ratio poids de foie-poids de corps (**Fig 34A**) n'est pas significativement modifié même si on peut noter une légère augmentation chez les HMGB1^{Δhep}. Par contre, en immunohistochimie, les coupes de foies des animaux délétés pour HMGB1 présentent une multiplication par 3 (p=0.059) du marquage à l'huile rouge (**Fig 34B**), ce qui suggère que la délétion d'HMGB1 augmente la quantité de lipides neutres présents dans le foie. La quantification par chromatographie gazeuse des espèces lipidiques (**Fig 34C**) indique aussi une augmentation significative de la quantité relative d'esters de cholestérol (p=0.0089). Cependant, la proportion relative des autres espèces comme les TG, les DG ou le cholestérol est inchangée. L'augmentation de la stéatose est corrélée à une augmentation de l'expression, dans les foies des animaux HMGB1^{Δhep} comparativement aux animaux HMGB1^{fl/fl}, de marqueurs géniques impliqués dans le stockage (*Cd36* : p=0.003 et *Cidec*) et la synthèse (*Fasn* : p=0.002, *Scd1* : p=0.002 et *Pparg*) des lipides (**Fig 34D**). De façon intéressante, ces modifications d'expression géniques sont associées à une diminution d'expression de marqueurs impliqués dans l'utilisation des lipides, notamment *Fgf21* (p=0.0148) (**Fig 34D**). L'augmentation de la stéatose n'est pas associée à une modification du métabolisme des lipoprotéines, en effet, l'activité de la protéine de transfert microsomale (**Fig 34E**) est identique entre les deux génotypes. En revanche, les animaux HMGB1^{Δhep} présentent une augmentation significative (p=0.0183) de l'export des VLDLs mesuré suite à injection de tyloxapol (**Fig 34F**). Cette augmentation de l'export peut être vue comme un effet compensatoire à l'accumulation de lipides dans le foie. L'augmentation de la stéatose n'est pas non plus liée à une modification de la prise alimentaire (**Fig 34G, gauche**), de l'utilisation des substrats puisque le respiratory exange rate (RER) est identique (**Fig 34G, centre**) ou de la thermogenèse (**Fig 34G, droite**) mesurés par calorimétrie indirecte. De manière à exclure tout effet artefactuel lié à l'utilisation du HFD60%, nous avons aussi étudié l'impact d'HMGB1 sur la progression de la stéatose hépatique induite par d'autres challenges nutritionnels comme un HFD60% de 20 semaines, un HFD60% + High Fructose (HFD60%+HS20%) de 12 semaines, un régime cétogénique de 8 semaines ou un CDHFD45% de 28 semaines (**Fig 35**). Malgré la diversité des substrats et des voies de signalisation mises en jeu dans ces différents challenges, les souris HMGB1^{Δhep} présentent de façon consistante une augmentation significative de la stéatose hépatique comparativement aux souris HMGB1^{fl/fl}.

Pris tous ensemble ces résultats semblent indiquer que la délétion d'HMGB1, lors d'un afflux massif de substrats ou plus largement lors d'un stress métabolique, pourrait favoriser le développement de

la stéatose en augmentant le stockage ou la synthèse des lipides, cependant à ce stade, nous ne pouvons pas exclure un effet de la délétion d'HMGB1 sur l'utilisation des substrats.

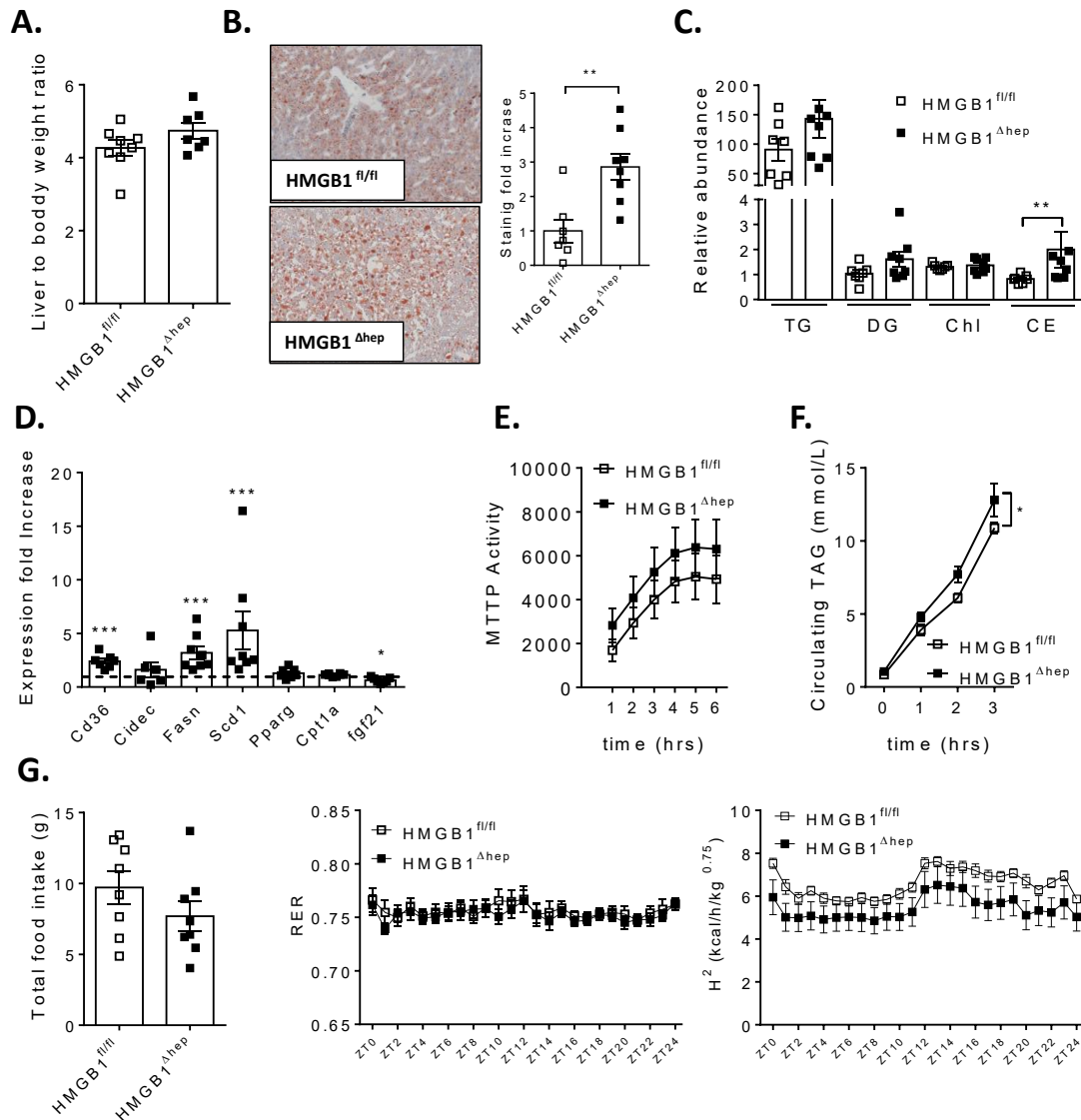


Figure 34 : La délétion d'HMGB1 dans les hépatocytes favorise la progression de la stéatose induite par un régime HFD60% de 12 semaines.

12 semaines après le début du régime le ratio poids de foie/poids de corps est mesuré (A) chez les animaux $HMGB1^{fl/fl}$ (n=8) et $HMGB1^{\Delta hep}$ (n=7). L'accumulation de lipides neutres est mesurée par un marquage à l'huile rouge (B) et par chromatographie gazeuse (C). L'expression génique de marqueurs du stockage (Cd36 et Cidec) de la synthèse (Fasn, Scd1 et Pparg) et de l'utilisation (Cpt1a et Fgf21) sont quantifiés par qPCR, la ligne en pointillée représente l'expression de ces marqueurs chez les animaux $HMGB1^{fl/fl}$. La synthèse (E) et l'export (F) des VLDL sont évalués ex-vivo et in-vivo respectivement. Une approche de calorimétrie indirecte permet de mesurer (G) la prise alimentaire (Gauche), le respiratory exchange rate (RER, centre) et la production de chaleur (H², droite). Données exprimées en moyenne \pm ESM, *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

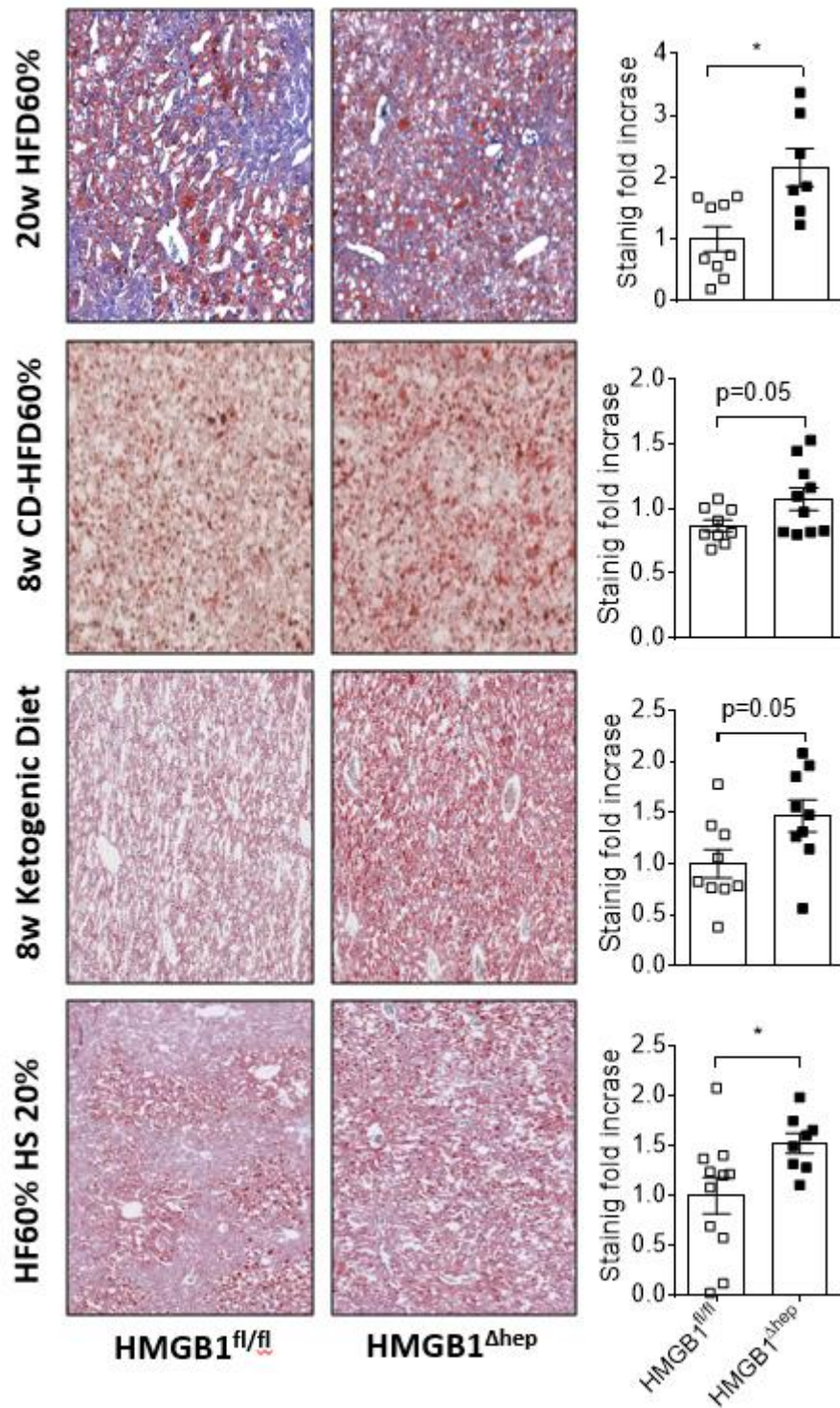


Figure 35 : La délétion d'HMGB1 favorise la progression de la stéatose indépendamment de l'approche nutritionnelle choisie.

La stéatose est évaluée par un marquage à l'huile rouge à l'issue d'un régime HFD60% pendant 20 semaines (20w HFD60%) ou d'un régime CD-HFD60% pendant huit semaines (8w CD-HFD60%) ou d'un régime cétogénique de huit semaines (8w Kétogenic Diet) ou d'un régime HFD60% complétementé avec 20% de sucre dans l'eau de boisson pendant 12 semaines (HF60% HS20%) chez des animaux HMGB1^{fl/fl} (n=8-10) et HMGB1^{Δhep} (n=7-10). Données exprimées en moyenne ± ESM, *p<0.05.

Conséquence physiopathologique de la délétion d'HMGB1 dans les hépatocytes :

Chez le patient obèse, la principale altération fonctionnelle rencontrée au cours de la progression de l'obésité et de la stéatose est la perte de sensibilité à l'insuline. Pour évaluer si la délétion d'HMGB1 pouvait induire de telles dysfonctions nous avons mis des souris HMGB1^{fl/fl} et HMGB1^{Δhep} en régime HFD60% pendant 20 semaines. Cette durée, plus longue que la précédente, est connue pour générer des perturbations du signal insulinaire dans les tissus périphériques dont le foie.

Après 20 semaines de régime HFD60% et comme attendu, les animaux HMGB1^{fl/fl} en régime HFD60% présentent une diminution significative de la phosphorylation d'AKT suite à une injection d'insuline comparativement aux animaux en NCD dans le foie, muscle gastrocnémien et le tissu adipeux péri-gonadique (PG) (données non montrées). Ce résultat suggère que, comme classiquement décrit dans la littérature, le régime HFD60% pendant 20 semaines permet d'induire une résistance à l'insuline dans les tissus périphériques. En revanche, les animaux HMGB1^{Δhep}, comparativement aux contrôles HMGB1^{fl/fl} présentent une diminution de la signalisation insuline mesurée par une diminution de la phosphorylation d'AKT d'environ 50% ($p=0.043$), en réponse à une stimulation aiguë à l'insuline, spécifiquement au niveau du foie (**Fig 36A**) puisque la phosphorylation d'AKT est identique dans le muscle gastrocnémien et le PG des souris HMGB1^{fl/fl} et HMGB1^{Δhep}. Ces résultats suggèrent que l'augmentation de la stéatose hépatique induite par la délétion d'HMGB1 est associée à une diminution de la sensibilité de la voie de signalisation à l'insuline dans le foie spécifiquement. Pour confirmer cette hypothèse *in vivo*, nous avons mesuré la production hépatique de glucose (PHG), dont l'augmentation correspond à un des traits caractéristiques de la résistance à l'insuline hépatique. Pour cela, nous avons réalisé un test de tolérance au pyruvate (PTT), qui est le test de référence chez la souris pour la mesure de la PHG. Lors du PTT (**Fig 36B**), l'aire sous la courbe des individus HMGB1^{Δhep} est significativement augmentée ($p=0.048$) comparativement aux individus HMGB1^{fl/fl}. Lors d'un jeûne long (16 heures), la glycémie des souris HMGB1^{Δhep} est significativement augmentée comparativement aux souris HMGB1^{fl/fl} (**Fig 36C**), passant de 150 mg/dL à 200mg/dL. Pris ensemble, ces deux résultats suggèrent que la délétion d'HMGB1 augmente la production hépatique de glucose.

La quantité de glycogène hépatique est aussi un indicateur de la sensibilité hépatique à l'insuline, en effet, cette hormone favorise l'entrée du glucose dans l'hépatocyte et son stockage sous forme de glycogène, contribuant ainsi à la diminution de la glycémie.

Après sacrifice, le contenu hépatique en glycogène a été mesuré par un marquage à l'acide périodique de Schiff (**Fig 36D**). Les animaux HMGB1^{Δhep} ont une quantité de glycogène hépatique diminuée d'environ 25% comparativement aux animaux contrôles.

Pris tous ensemble, ces résultats suggèrent que lors d'un régime hyper lipidique au long cours, la délétion d'HMGB1 favorise l'apparition d'une insulino-résistance hépatique spécifiquement.

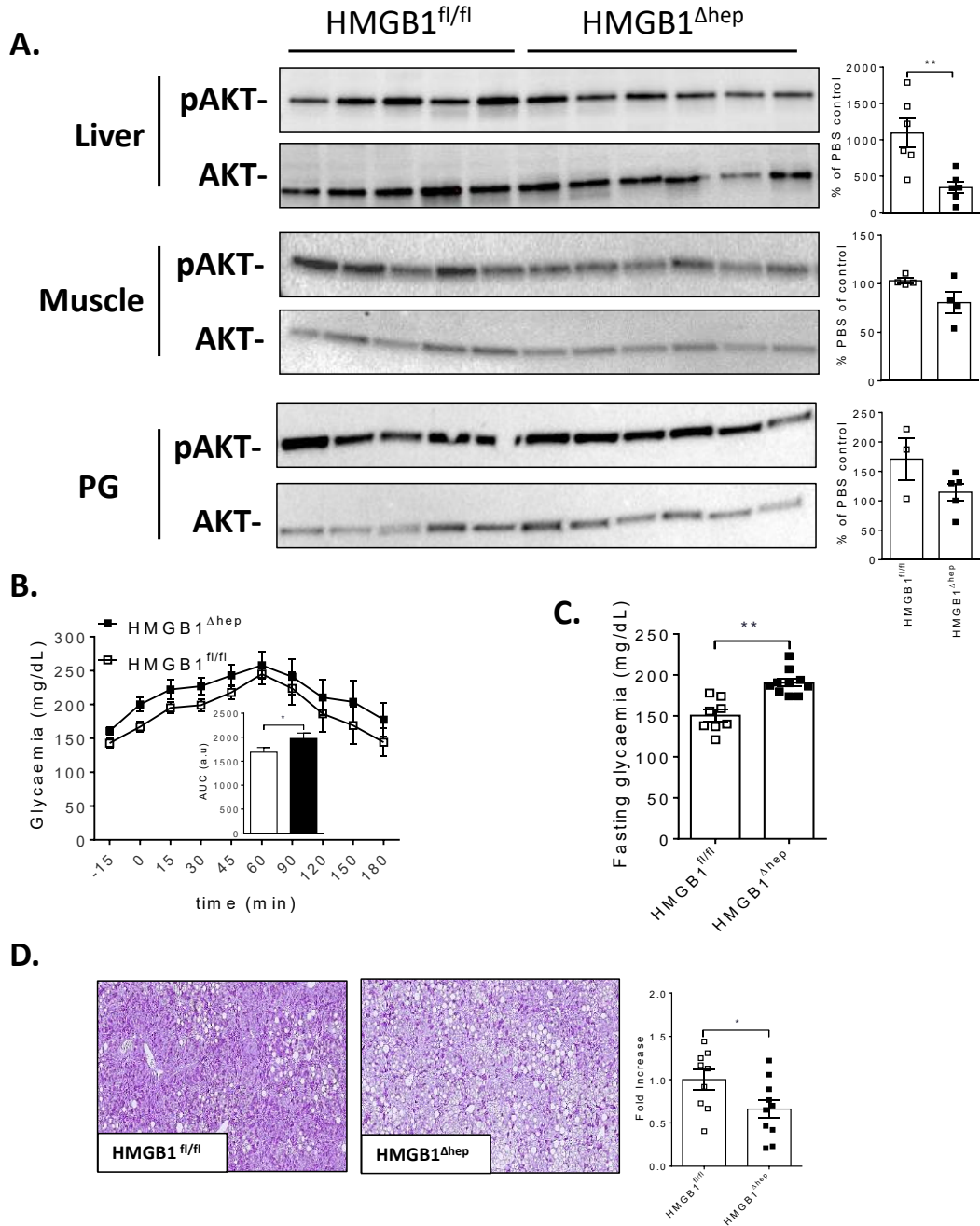


Figure 36 : La délétion d'HMGB1 dans l'hépatocyte favorise l'apparition d'une résistance à l'insuline hépatique.

Après 20 semaines de régime HFD60%, les animaux reçoivent un bolus d'insuline (0,75U/kg, i.v.) et sont sacrifiés 10 minutes après. La phosphorylation d'AKT est évaluée par western blot dans le foie, le muscle gastrocnémien et le tissu adipeux péri-gonadique (PG). Les résultats sont représentés en pourcentage d'induction par rapport au groupe HFD60% injectés au PBS (A). Pour évaluer la production hépatique de glucose un PTT est réalisé et l'aire sous la courbe est calculée (B), la glycémie à jeun est mesurée après un jeûne overnight (C). La quantité de glycogène est mesurée sur des coupes de foies marquées à l'acide périodique de Shift. Données exprimées en moyenne \pm ESM, * p <0.05, ** p <0.01.

Rôle d'HMGB1 hépatocytaire dans l'activité des voies de LDN et de β -oxydation :

Les résultats obtenus précédemment laissent suggérer que la délétion d'HMGB1 pourrait favoriser la progression de la stéatose. Nous pensons, au vu des résultats précédents, que cette augmentation de

stéatose pourrait être due soit à une augmentation de l'activité de la LDN soit à une diminution de la β -oxydation. Pour valider cette hypothèse nous avons mis en place, en collaboration avec l'équipe de Cédric Moro et Dominique Langin au sein de l'institut, une mesure de l'activité des voies de la LDN et de la β -oxydation dans des cultures primaires d'hépatocytes murins.

La mesure de l'activité de la LDN sur des hépatocytes primaires montre que, même à l'état basal, les hépatocytes issus de souris HMGB1 ^{Δ hep} ont une activité de la LDN significativement supérieure aux hépatocytes issus de souris contrôles. Comme attendu, cette différence est potentialisée par l'ajout d'insuline dans le milieu de culture (**Fig 37A**). L'activité de la LDN dans des hépatocytes issus de souris nourries avec un régime HFD60% pendant 20 semaines (**Fig 37B**) est significativement augmentée à l'état basal, cependant, dans ce contexte de stéatose, l'action de l'insuline est perdue, ce qui pourrait s'expliquer par une insulino-résistance induite par le régime. Afin de confirmer ces résultats *in-vitro* nous avons mesuré l'activité de la LDN *in-vivo* dans des animaux sous régime standard (**Fig 37C**). Ici la mesure de la LDN se fait par comptage de l'activité contenue dans les lipides neutres 1 heure après l'injection de glucose tritié dans des animaux mis à jeun pendant 6 heures. Suite à l'injection de glucose tritié chez des animaux en régime standard, nous observons une activité significativement augmentée spécifiquement dans les lipides hépatique issus de foies de souris HMGB1 ^{Δ hep} ($p=0.0317$) confirmant les résultats obtenus sur hépatocytes isolés. Nous avons aussi tenté de mesurer l'activité de la LDN *in vivo* chez des animaux nourris en HFD60% pendant 20 semaines mais sans résultats probants (**Fig 37D**). Au cours de cette mesure nous avons utilisé le même protocole que pour des souris en normal diet sans prendre en compte la variation du volume de dilution du traceur, ce qui pourrait expliquer l'absence de résultats concluants. Nous sommes actuellement en train de continuer la mise au point de la mesure de la LDN *in vivo* sur souris obèses.

In vitro, l'oxydation du palmitate, reflet de l'activité de la β -oxydation, n'est pas différente entre des hépatocytes issus de souris HMGB1^{fl/fl} ou de souris HMGB1 ^{Δ hep} et ce, quel que soit le régime (**Fig 37E**, NCD et **Fig 37F** HFD60% 20 semaines). Afin de confirmer ces résultats *in vivo* nous avons mesuré, par qPCR après une mise à jeun de 24 heures, la cétonémie et la glycémie. Comme attendu, les souris HMGB1^{fl/fl} et HMGB1 ^{Δ hep} présentent une augmentation drastique du niveau des corps cétoniques et une diminution sévère de la glycémie comparativement aux souris nourries, mais aucune différence significative n'est observée entre les souris HMGB1^{fl/fl} et HMGB1 ^{Δ hep} après 24h de jeûne (**Fig 37G**).

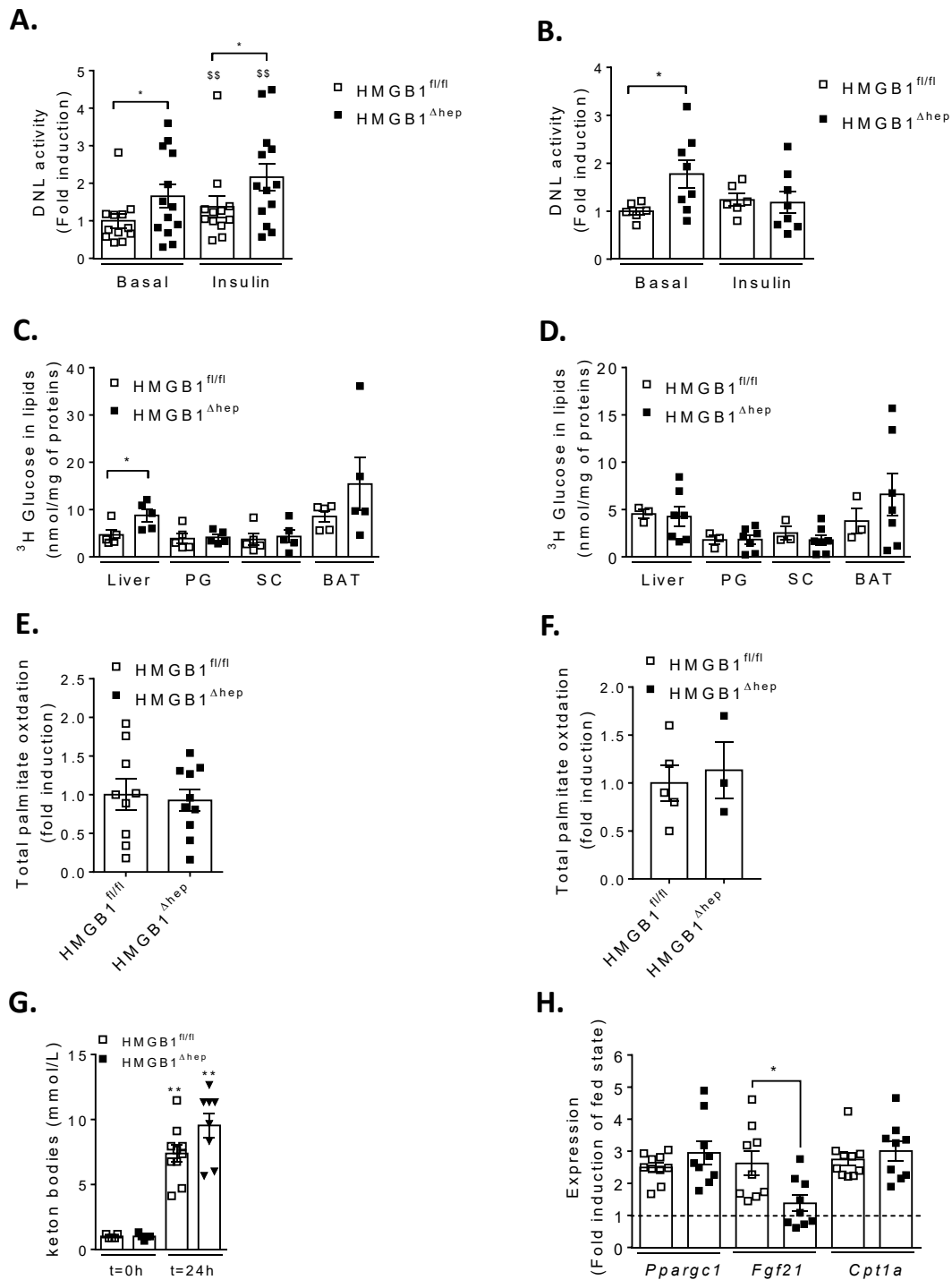


Figure 37 : La délétion d'HMGB1 dans les hépatocytes entraîne une augmentation de l'activité de la LDN.

L'activité de la LDN est mesurée en présence d'acétate radio-marqué dans des hépatocytes primaires de souris en NCD (A) ou après 20 semaines de HFD60% (B). In vivo l'activité de la LDN est quantifiée dans le foie, le tissu adipeux péri-gonadique (PG), sous cutané (SC) ou brun (BAT) suite à un bolus de glucose tritié, chez des souris en NCD (C) ou après 20 semaines de HFD (D). L'oxydation du palmitate est mesurée in vivo dans hépatocytes primaires de souris en NCD (E) ou après 20 semaines de HFD60% (F). In vivo au cours d'une mise à jeun de 24 heures les corps cétoniques sont mesurés à t=0h et à t=24h (G). L'expression hépatique de marqueurs géniques du catabolisme des lipides (*Ppargc1*, *Fgf21* et *Cpt1a*) est mesurée par qPCR après 24 heures de jeun. Données exprimées en moyenne \pm ESM, * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; \$\$\$ $p < 0.001$; \$\$\$\$ $p < 0.0001$ vs basal..

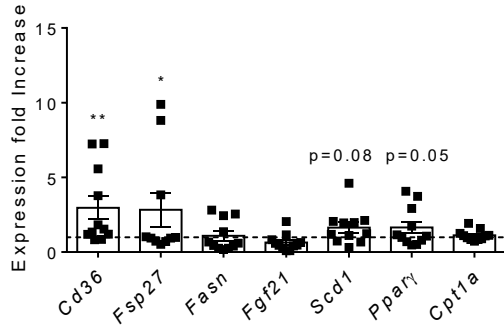
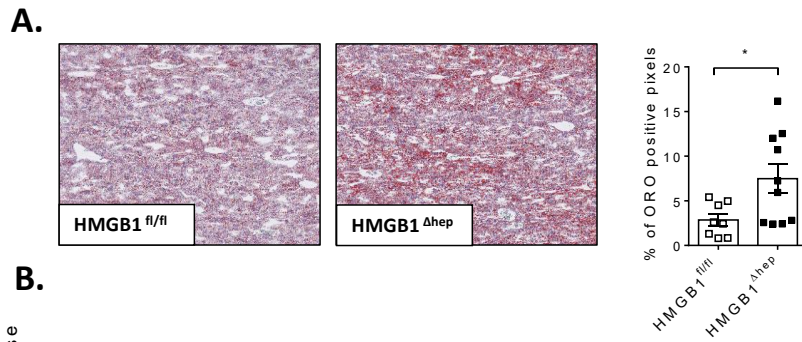
De plus, l'expression hépatique de marqueurs géniques impliqués dans le catabolisme lipidique comme *Ppargc1* et *Cpt1a* (**Fig 37H**) augmente avec la mise à jeun, mais les niveaux d'expression restent identiques entre les deux génotypes. Le seul effet notable de la délétion d'HMGB1 est la diminution significative de l'expression de *Fgf21* ($p=0.0188$).

Pris tous ensemble, ces résultats suggèrent que la délétion d'HMGB1 favoriserait la progression de la stéatose en augmentant la voie de la LDN, sans modification de la β -oxydation *in vivo* et ceci de manière cellulaire autonome.

Effecteurs impliqués dans la régulation de la LDN par HMGB1 :

Les résultats précédents nous apprennent que l'administration d'un bolus de glucose suite à une mise à jeun de 6 heures est suffisant pour augmenter significativement l'activité de la LDN chez les animaux HMGB1 ^{Δ hep} comparativement aux animaux contrôles HMGB1^{fl/fl} (**Fig 37**). Afin de comprendre quel(s) sont le(s) gène(s) impliqué(s) dans cette augmentation de la LDN, nous avons mis en place une nouvelle approche nutritionnelle visant à augmenter les voies de la LDN, au cours de laquelle les animaux sont mis à jeun pendant 6 heures puis renourris avec le régime standard et une solution de glucose 20%. Dans ce contexte, nous observons une augmentation significative du marquage à l'huile rouge (**Fig 38A**) chez les souris HMGB1^{fl/fl} à jeun/renourries, comparativement aux souris nourries, validant le protocole expérimental. De manière intéressante, les animaux HMGB1 ^{Δ hep} comparativement aux contrôles HMGB1^{fl/fl} présentent une augmentation ($p=0.0188$) du marquage à l'huile rouge. Cette stéatose accrue s'accompagne d'une augmentation significative de l'expression des gènes *Cd36* ($p=0.023$) et *Fsp27* ($p=0.035$) impliqués dans le stockage. Il existe aussi une nette tendance à l'augmentation de l'expression de *Scd1* ($p=0.08$) et *Ppar γ* ($p=0.05$) (**Fig 38B**).

Pour aller plus loin dans la compréhension des mécanismes moléculaires engagés et notamment identifier un facteur de transcription particulier, nous avons réalisé un microarray visant à comparer les transcriptomes des animaux WT suite au challenge à jeun/renourris. Via une analyse ingenuity pathway analysis, nous avons recherché des effecteurs amont pouvant expliquer les modifications d'expressions géniques induites lors du challenge jeun/réalimentation (**Fig 38C**). Cette analyse révèle que le facteur de transcription PPAR γ avec un score z d'activation de 2.242 ($p=0.000251$), peut expliquer en grande partie les différences d'expression génique entre les deux groupes. De plus, l'analyse du jeu de données selon la méthode schématisée **Fig 38D** permet de mettre en évidence l'implication de la voie de signalisation PPAR γ dans les différences d'expressions géniques observées. Pris tous ensemble ces résultats semblent indiquer que PPAR γ pourrait constituer un médiateur important de l'effet « pro-stéatose » de la délétion d'HMGB1.



C.

	Upstream Regulator	Activation z-score	p-value of overlap
Up-Regulated	PPARG	2,242	0,000251
	NR1H3	2,062	0,0105
	RARA	1,564	0,000321
	PPARA	1,19	5,52E-11
	AHR	1,068	0,000000906
Down-Regulated	NR0B2	-0,164	0,0116
	AR	-0,261	0,00774
	NR1D1	-0,692	0,0257
	PPARD	-0,87	2,31E-08
	RORC	-1,067	0,00000337

D.

KEGG pathway description	FDR	Observed gene count
Metabolic pathways	0.00019	22
Steroid biosynthesis	0.000418	4
PPAR signaling pathway	0.000418	6
AMPK signaling pathway	0.000432	7
Circadian rhythm	0.00104	4

Figure 38 : l'effet « pro-stéatose » de la délétion d'HMGB1 est médié par un programme de transcription PPARγ-dépendant. Suite à une mise à jeun de 6 heures suivie d'un re-nourrissage de 8 heures, l'accumulation de lipides neutres est quantifiée par un marquage à l'huile rouge (A). L'expression génique de marqueurs du stockage (Cd36 et Cidec) de la synthèse (Fasn, Scd1 et Pparg) et de l'utilisation (Cpt1a et Fgf21) est quantifié par qPCR, la ligne en pointillée représente l'expression de ces marqueurs chez les animaux HMGB1^{fl/fl}(B). L'analyse des données du microarray en ingenuity pathway analysis (IPA) permet de dégager certains régulateurs amont (C). La méthode décrite en (D) permet de mettre en évidence les KEGG reportées dans le tableau de droite. Données exprimées en moyenne ± ESM, *p<0.05, ** p<0.01.

Effet de la délétion d'HMGB1 hépatocytaire sur l'activité transcriptionnelle de PPAR γ :

Les résultats du microarray suggèrent que PPAR γ pourrait être impliqué dans le phénotype observé lors de la délétion d'HMGB1. Dans le but de valider l'implication directe de ce facteur de transcription, nous avons mis en place une approche pharmacologique reposant sur l'utilisation *in vivo* d'un agoniste de PPAR γ classiquement utilisé dans la littérature : la rosiglitazone (rosi).

Pour cela les animaux adultes HMGB1^{fl/fl} et HMGB1 ^{Δ hep} en chow diet ont reçu une injection i.v. de rosiglitazone (25mg/kg) 18 heures avant le sacrifice. Afin de vérifier l'efficacité du traitement, nous avons vérifié par qPCR l'induction des gènes-réponse de PPAR γ *Ucp1* et *Elovl3* dans les dépôts adipeux sous cutanés (**Fig 39A**). Ici, le traitement à la rosi durant 18 heures est suffisant pour induire l'expression de ces gènes validant ainsi la dose de rosi et la cinétique de notre protocole. Au niveau du foie (**Fig 39B**), l'injection aigue de rosi induit significativement l'expression des gènes cibles de PPAR γ , comparativement à l'injection du véhicule, validant ainsi au niveau hépatique l'efficacité de notre traitement. De plus l'analyse par qPCR de gènes classiquement induits par PPAR γ montre que sur les 20 gènes-réponse étudiés, 12 sont significativement up régulés chez les souris HMGB1 ^{Δ hep} comparativement aux souris HMGB1^{fl/fl} (**fig 39B**). L'ensemble de ces résultats suggère que la délétion d'HMGB1 pourrait augmenter l'activité de PPAR γ induite par la rosiglitazone, confirmant un lien entre PPAR γ et HMGB1. Dans ce modèle, nous pourrions imaginer qu'HMGB1 réprimerait l'activité transcriptionnelle de PPAR γ .

Mais, lors de la délétion d'HMGB1 l'augmentation de l'activité transcriptionnelle de PPAR γ pourrait suffire à expliquer l'augmentation de l'activité de la LDN *in vivo*. Pour vérifier cette hypothèse, des animaux HMGB1^{fl/fl} et HMGB1 ^{Δ hep} ont été infectés par des adénovirus codant soit pour un short hair-pin ARN (shRNA) ciblant PPAR γ (ShPPAR γ) soit par un Sh contrôle (ShSCR), 10 jours après l'infection les animaux sont sacrifiés et l'expression de PPAR γ hépatique est mesurée par western blot (**Fig 39C**). En présence du ShPPAR γ , l'expression de PPAR γ est diminuée significativement d'environ 50% et ce quel que soit le génotype (HMGB1^{fl/fl}, p=0.0048 et HMGB1 ^{Δ hep}, p=0.0008). Ensuite, 10 jours après l'infection, afin de solliciter la voie de la LDN, le protocole de jeûne pendant 6 heures puis re-nourrissage pendant 8 heures est réemployé, puis la progression de la stéatose est mesurée par un marquage des coupes de foies à l'huile rouge (**Fig 39D**). Ici, nous reproduisons les résultats obtenus précédemment : la délétion d'HMGB1 favorise l'accumulation de lipides neutres dans les hépatocytes (p=0.0214) chez les animaux HMGB1^{fl/fl} et HMGB1 ^{Δ hep} injectés avec le ShSCR contrôle. En présence du ShPPAR γ cet effet est perdu chez les animaux HMGB1^{fl/fl} (p=0.0103), l'injection du ShPPAR γ limite le développement d'une stéatose chez les animaux HMGB1 ^{Δ hep}. Ainsi ces résultats suggèrent que la progression de la stéatose chez les animaux HMGB1 ^{Δ hep} est un phénomène PPAR γ dépendant.

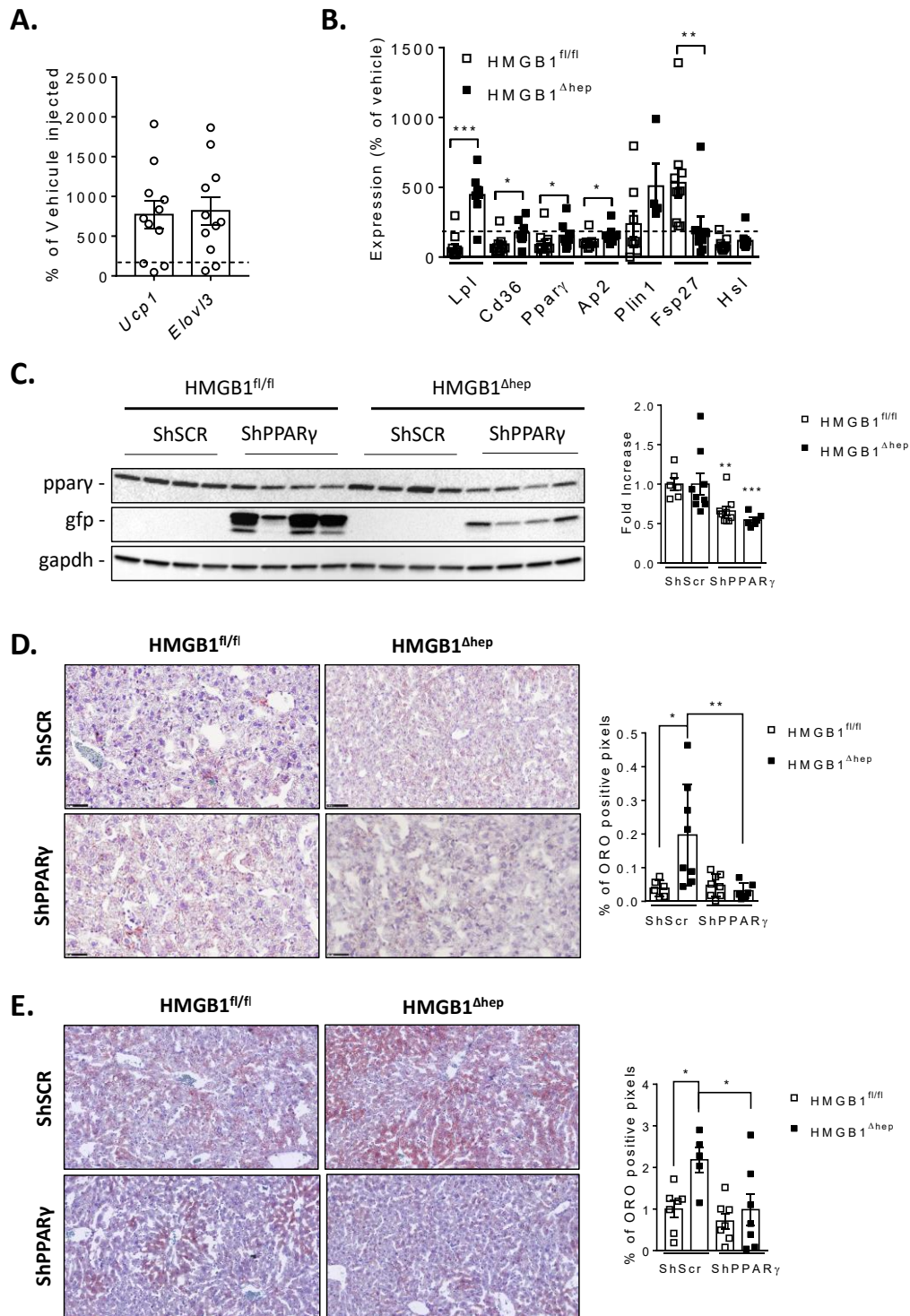


Figure 39 : La délétion de PPAR γ reverse le phénotype des souris HMGB1 Δ hep.

18 heures après l'injection i.v. de 25mg/kg de rosi, l'expression génique des marqueurs du browning *Ucp1* et *Elovl3* est mesurée dans le tissu adipeux sous-cutané par qPCR (A). Après l'injection de rosi (*HMGB1^{fl/fl}* n=11 et *HMGB1^{Δhep}* n=8), l'expression hépatique des gènes cibles de PPAR γ (*Lpl*, *Cd36*, *Pparγ*, *Ap2*, *Plin1* et *Cidec*) est mesurée par qPCR (B). 10 jours après l'injection soit du virus codant pour le ShSCR (*HMGB1^{fl/fl}* n=7 et *HMGB1^{Δhep}* n=8) soit pour le ShPPAR γ (*HMGB1^{fl/fl}* n=9 et *HMGB1^{Δhep}* n=8), la délétion de PPAR γ dans le foie, est évaluée par western blot (C). Lors du challenge de mise à jeun 6h/ re-nourissage 8h, l'accumulation de lipides neutres est quantifiée par un marquage à l'huile rouge. Après 4 semaines de HFD60% les animaux sont injectés avec un adénovirus codant pour le ShSCR (*HMGB1^{fl/fl}* n=7 et *HMGB1^{Δhep}* n=5) ou le ShPPAR γ (*HMGB1^{fl/fl}* n=7 et *HMGB1^{Δhep}* n=7) et 10 jours après l'injection, la stéatose est quantifiée par un marquage à l'huile rouge (E). Données exprimées en moyenne \pm ESM, *p<0.05, ** p<0.01.

Pour évaluer l'effet de la délétion de PPAR γ dans un contexte de stéatose induite par un régime gras, les animaux sont placés sous régime HFD60% pendant 4 semaines puis infectés par des adénovirus codant soit pour un shRNA ciblant PPAR γ (ShPPAR γ) soit pour un Sh contrôle (ShSCR). 10 jours après l'infection les animaux sont sacrifiés et le contenu en lipides neutres est évalué par un marquage à l'huile rouge. Dans ce contexte, la délétion d'HMGB1 favorise l'accumulation de lipides neutres dans le foie ($p=0.0363$) et cet effet est perdu en présence du ShPPAR γ ($p=0.0333$) (**Fig 39E**).

Pris tous ensemble ces résultats suggèrent que l'accroissement d'activité de la voie de la LDN induite par la délétion d'HMGB1 pourrait être médiée par une augmentation de l'activité de PPAR γ .

Effet de la délétion d'HMGB1 sur le transcriptome hépatique :

Afin d'identifier des voies de régulation ou des fonctions biologiques régulées par HMGB1 et renforcer éventuellement les hypothèses de travail déjà en place, nous avons lancé une approche sans *a priori* basée sur l'étude du transcriptome par microarray sur des biopsies de foie issues de souris HMGB1^{fl/fl} et HMGB1 ^{Δ hep} en régime hyper lipidique, mises à jeun 6h ou mises à jeun/renourries 6+8. L'analyse de ces données en suivant la méthode schématisée **Fig38D**, panel de gauche, permet d'isoler un certain nombre de gènes significativement augmentés ou inhibés par la délétion d'HMGB1. En construisant un diagramme de Venn pour les gènes up ou down régulés (**Fig 40A** et **40B**), nous avons pu déterminer quels sont les gènes communément régulés par la délétion d'HMGB1 dans les 3 challenges nutritionnels : 12 gènes sont retrouvés up-régulés et 31 sont down-régulés dans les trois conditions, la liste de ces gènes est disponible en annexe 1. En utilisant le logiciel Ingenuity Pathway Analysis (IPA), nous avons cherché à mettre en évidence quel(s) facteur(s) de transcription pouvaient expliquer les effets de la délétion d'HMGB1 indépendamment des conditions expérimentales choisies (HFD12 semaines, **Fig 40C**, mis à jeun 6 heures et renourris 8 heures, **Fig 40D**, ou mis à jeun 6h, **Fig 40E**). Cette analyse révèle que les facteurs de transcription ROR α et ROR γ pourraient être le(s) dénominateur(s) commun(s) à toutes les régulations géniques induites par la délétion d'HMGB1. Au final cette étude nous permet d'envisager un régulateur en amont d'HMGB1 comme ROR α dont l'activité a par ailleurs déjà été reliée à l'action de PPAR γ .

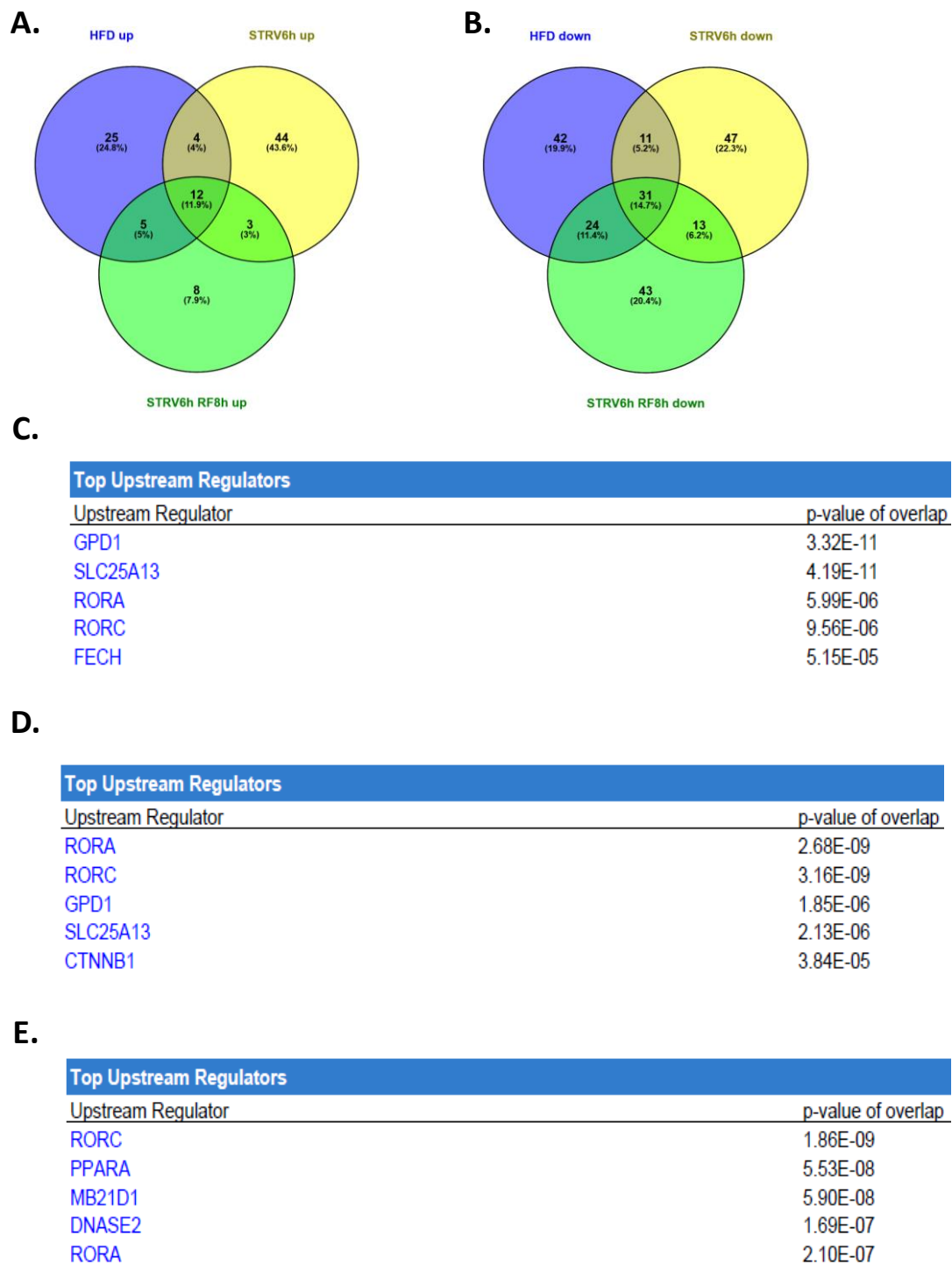


Figure 40 : ROR α et ROR γ pourraient en partie expliquer les effets géniques observés lors de la délétion hépatique d'HMGB1.

L'analyse du microarray comme décrit Fig38 a permis de dessiner les diagrammes de Venn (A) et (B) comprenant les gènes up régulés et down régulés, respectivement, au cours du HFD60% pendant 12 semaines (HFD12), de la mise à jeun pendant 6 heures (STRV6H) et du challenge de mise à jeun 6 heures puis re-nourissage 8 heures (STRV6H RF8H). Captures d'écran montrant les régulateurs d'amonts trouvés au cours d'une IPA pour le HFD60% pendant 12 semaines (C), du challenge de mise à jeun 6 heures puis re-nourissage 8 heures (D) et de la mise à jeun pendant 6 heures (E).

Compte tenu des interactions d'HMGB1 avec la double hélice d'ADN, nous avons développé puis validé une approche d'immunoprécipitation de chromatine couplée au séquençage (ChIPseq), cette approche pourrait nous permettre de comprendre comment HMGB1 régule l'expression des gènes de la LDN. En collaboration avec l'équipe de Gaelle Legube au CBI de Toulouse, nous avons dans un premier temps testé plusieurs anticorps dans un modèle cellulaire. Afin de valider la spécificité de notre anticorps nous avons réalisé des ChIP puis quantifié par qPCR la liaison d'HMGB1 sur le promoteur de la topo isomérase II (TopoII), comme décrit dans la littérature, en manipulant l'expression d'HMGB1 à l'aide d'un siRNA. En conditions basales, HMGB1 semble se lier au promoteur de la Topo isomérase II, comme déjà publié, mais aussi dans des régions intergéniques (**Fig 41A**). Lors de l'inhibition de l'expression d'HMGB1 en utilisant un siRNA (**Fig 41B**), l'enrichissement du promoteur de la Topo isomérase II est perdu, suggérant ainsi que l'anticorps est bien spécifique (**Fig 41B**). Nous avons ensuite validé le protocole de ChIP sur biopsies de foie congelé, en mesurant l'enrichissement et la qualité des librairies d'ADN immunoprécipité. Après toutes ces étapes de validation, nous avons pu préparer des librairies d'ADN à partir de ChIP issus de souris HMGB1^{fl/fl} et HMGB1^{Δhep}, utilisé comme contrôle négatif, préparées à partir de biopsies issues de souris soumises à un régime contrôle (**Fig 41C-D**), hyperlipidique de 12 semaines (**Fig 41E-F**) et d'un challenge mise à jeun 6 heures puis renourris pendant 8 heures (**Fig 41G-H**). Les séquençages viennent de nous parvenir, après une longue attente, et nous pouvons juste faire une analyse très préliminaire. L'ensemble des séquences est exploitable, et globalement l'ensemble des signaux obtenus à partir des librairies de HMGB1^{fl/fl} sont très largement supérieurs à ceux issus des librairies générées à partir des biopsies des souris HMGB1^{Δhep} (**Fig 41C, E et G**) validant notre approche expérimentale. L'analyse des librairies montre du signal sur l'ensemble des chromosomes (Données non montrées), mais le profil de liaison semble être « atypique », différent de la signature classique d'un facteur de transcription ou d'une histone. Il semblerait que plusieurs profils de liaison se dégagent : HMGB1 se trouve souvent en abondance sur l'extrémité 5' des gènes (**Fig 41D, F et H**) et sur les exons (**Fig 41D, F et H**).

De plus, selon nos observations, il semblerait que l'abondance d'HMGB1 serait inversement corrélée au nombre d'exons du gène mais ces résultats sont à confirmer par l'analyse bio-informatique en cours.

L'analyse en profondeur de ces patterns en condition basale, plus l'étude détaillée des librairies des conditions HFD et mis à jeun/renourri 6+8 sera extrêmement informative sur le rôle « transcriptionnel » que peut jouer HMGB1 et le lien moléculaire avec des gènes de la LDN.

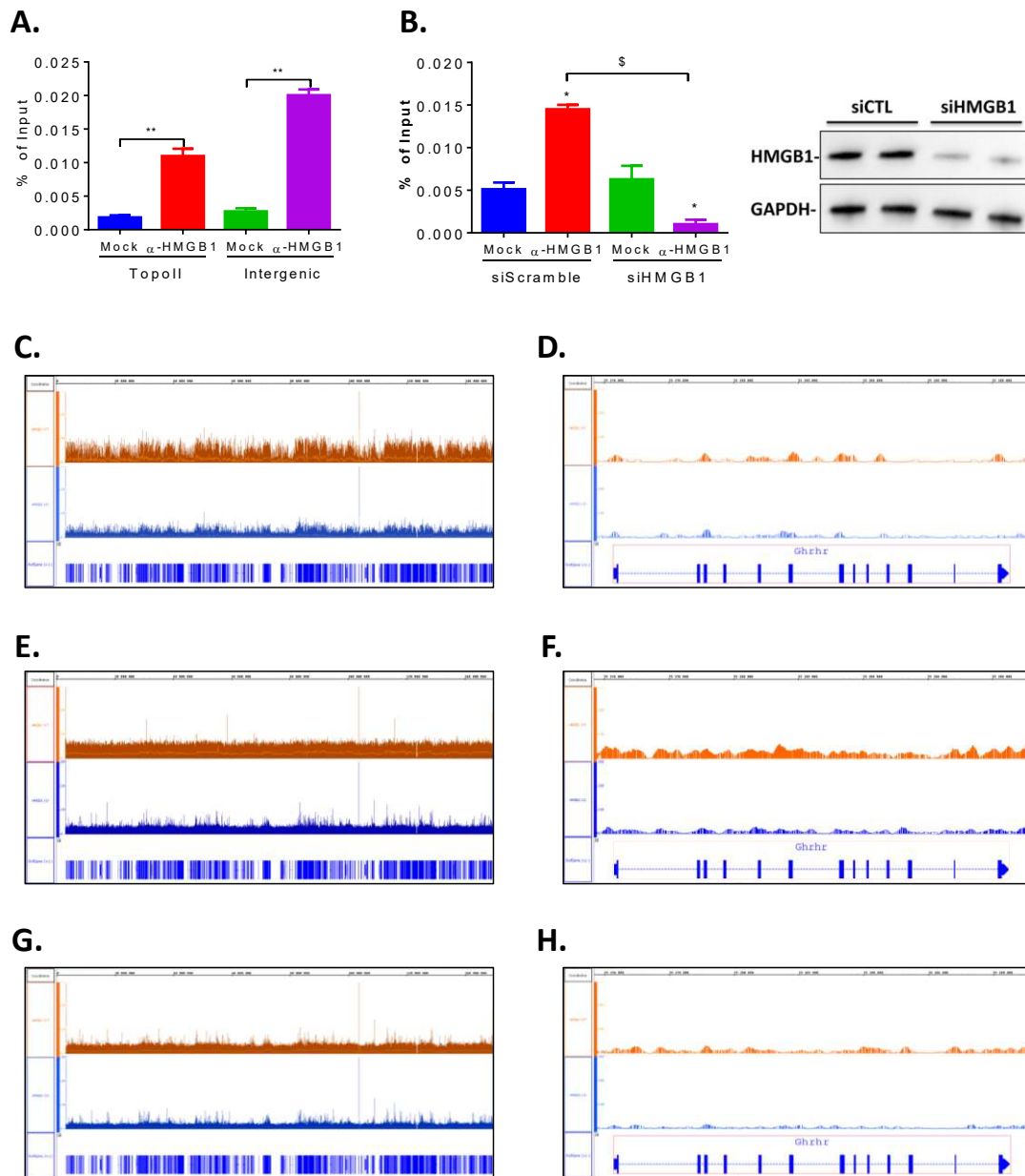


Figure 41 : HMGB1 présente un profil atypique de liaison à l'ADN.

Dans nos mains la ChIP fonctionne (A) et l'utilisation d'un siRNA dirigé contre HMGB1 nous permet de valider la spécificité de l'anticorps utilisé (B). L'analyse en ChIP-seq des librairies d'ADN issues de souris HMGB1^{fl/fl} et HMGB1^{Δhep}, préparées à partir de biopsies issue de souris soumises à un régime contrôle (C-D), hyperlipidique de 12 semaines (E-F) et d'un challenge mise à jeun 6 heures puis renourris pendant 8 heures (G-H) montre un signal spécifique, ici sur le chromosome 6 (C, E et G). A titre d'exemple, les panels D, F et H présentent les profils obtenus sur une zone choisie au hasard sur le chromosome 6 correspondant au gène *Ghrh*.

Conclusion :

Ainsi, au cours de cette étude nous avons pu mettre en évidence un nouveau rôle d'HMGB1 dans la progression de la stéatose induite par un régime hyper lipidique. En effet, HMGB1 semble être un répresseur de l'activité de la LDN hépatique. Jusqu'à lors non décrit, nos données suggèrent que HMGB1 régulerait la LDN de façon directe ou indirecte en priorité via la répression de l'activité du facteur de transcription PPAR γ .

Bien que majoritairement étudié pour son rôle extracellulaire et pro-inflammatoire dans le foie, HMGB1 semble être un acteur clef dans la régulation de l'expression génique comme le laissait supposer le phénotype obtenu lors du KO total (Calogero et al., 1999). Cependant l'absence d'HMGB1 hépatique n'induit pas, en condition basale, de phénotype marqué entre les animaux HMGB1^{fl/fl} et les animaux HMGB1 ^{Δ hep} (**Fig 32** et (Huebener et al., 2014)), ce qui laisse supposer un rôle non essentiel pour HMGB1 dans la régulation de l'expression génique en condition basale.

Le lien moléculaire entre PPAR γ et HMGB1 reste encore flou. Cependant, malgré la diversité de conditions analysées, les données du microarray (**Fig 38, Fig 40** et données non montrées) révèlent qu'il pourrait exister un lien entre HMGB1 et les rythmes circadiens. De façon intéressante, le lien entre rythmes circadiens et activité de la lipogenèse *de novo* a déjà été établi (Alenghat et al., 2008; Feng et al., 2011; Zhang et al., 2017b). Récemment, une étude a démontré que ROR α régule négativement l'activité transcriptionnelle de PPAR γ (Kim et al., 2017). Pris tous ensemble ces résultats nous permettent de poser l'hypothèse d'un lien entre HMGB1 et des régulateurs du rythme circadien comme ROR α , PPAR γ et la LDN.

B. Objectif II : Etude du rôle biologique de la forme circulante d'HMGB1 au cours du stress métabolique

1. Matériel et méthodes

Animaux : Le protocole a été réalisé en accord avec la charte éthique de l'INSERM (US006 CREFRE - CEEA-122, 1710480320).

Traitement pharmacologique : Les inflachromènes(ICM) et la Glycyrrhizine (GLY) sont administrés quotidiennement en intra-péritonéal à une dose de 10mg/kg et 50mg/kg respectivement. Le groupe non traité reçoit un volume équivalent de véhicule composé soit de NaCl 0.9% stérile, 5% DMSO, 20% β -cyclodextrine (ICM) soit du PBS (GLY)

Approches nutritionnelles : Obésité induite par l'alimentation : Les souris sont nourries soit avec un régime standard (NCD, Research Diet) soit avec un régime hyper-lipidique contenant 60% (HFD60%, Research Diet) de calories sous forme de lipides pendant 28 jours. Fibrose hépatique induite par l'alimentation : Les souris sont nourries soit avec un régime standard (NCD) soit avec un régime déficient en choline et méthionine (MCDD, Research Diet) pendant 28 jours. Lors du sacrifice, les tissus sont récupérés, pesé, congelés dans l'azote liquide puis stockées à -80°C jusqu'à utilisation.

Test de tolérance oral au glucose : Après un jeûne overnight (18h00-8h00) les souris sont gavées (HFD) avec une solution de glucose. La dose administrée est de 1,5g de glucose par kg de poids corporel. L'évolution de la glycémie est suivie par prélèvement sanguin au niveau de la veine caudale (Glucomètre Accu-Chek, Roche®).

Quantification des lipides neutres : 50mg de foie sont homogénéisés dans 1mL d'eau : méthanol (1 :2 volumes), EGTA (5mM). Les lipides sont extraits avec un mélange méthanol : chloroforme : eau (2,5 :2,5 :1,7 volumes), purifiés avec une colonne SPE, desséchés puis solubilisés dans le l'acétate d'éthyle. La fraction obtenue est analysée par chromatographie gazeuse.

Histologie : Inclusions et coupes : Les inclusions en paraffine et les coupes (5 μ m) sont réalisées par le plateau histologie de l'I2MC. Pour les cryo-sections, les échantillons sont sortis de la formaline après 24h et transférés dans une solution de sucrose 30%. Après 72h les échantillons sont inclus dans l'OCT

puis congelés à -80°C. Colorations : Brièvement, les lames blanches déparaffinées sont colorées avec du Rouge Sirius (1% de Rouge Sirius dilué dans de l'acide picrique) pendant 1h30. Les lames sont ensuite montées avec la colle Eukitt. Les cryo-coupes sont incubées dans de l'isopropanol 60% avec coloration dans l'huile rouge ou Oil-Red-O (solution de 0,5% dans de l'isopropanol) pendant 15 minutes. Les lames sont ensuite montées en milieu aqueux. Numérisation et quantification : Les lames sont numérisées grâce au scanner Nanozoomer du fabricant Hamamatsu. L'analyse d'image et la quantification sont réalisées en utilisant le logiciel Photoshop®. Les photos montrées sont représentatives.

Dosages biochimiques plasmatiques : Le sang a été prélevé dans la veine cave lors du sacrifice. Le plasma a été obtenu par une centrifugation 5 minutes; 4 °C; 8000 rpm. Les dosages des transaminases (ALT pour ALanine aminoTransférase, AST pour ASpartate aminoTransférase) ont été effectués en collaboration avec la plateforme Anexplo/Genotoul de Toulouse (<http://anexplo.genotoul.fr/>).

Expression Génique par RT-PCR en temps réel : Extraction des ARN sur colonne : les tissus sont broyés (Precellys™, Bertin Technologies) avec 1mL de Qiazol. Les lysats sont ensuite délipidés par ajout de 200µl de chloroforme et centrifugation (15 min, 4°C, 4000 rpm). La phase aqueuse est transférée dans l'éthanol absolu (350µL). Les échantillons (700µL) sont ensuite transférés sur colonnes. Après les différentes étapes décrites dans le protocole du kit et traitement à la DNase pendant 10 minutes, les ARN en solution aqueuse sont dosés par spectrophotométrie (Xpose™, Trinean®). Reverse transcription et qPCR : (kit «High Capacity cDNA reverse transcription » (Applied Biosystem®)). La RT est réalisée selon les consignes du fabricant à partir de 500 ng d'ARN. Lors de la qPCR, les ADNc sont mis en présence des amorces sens et anti-sens (Eurogentec®) diluées à leurs concentrations optimales.

Mesure de la masse grasse et de la masse maigre : Les mesures des taux de masse grasse et de masse maigre ont été effectuées par imagerie par résonance magnétique (EchoMRI - 100TM 3 en 1TM). Les résultats ont été exprimés en pourcentage de masse grasse et maigre rapporté au poids de la souris.

Statistiques : Les résultats sont exprimés sous la forme de moyenne accompagnée de l'erreur standard à la moyenne. La différence statistique des résultats est déterminée en utilisant un test de Mann-Whitney ou d'une two-way ANOVA. Le niveau de significativité choisie est p value <0.05 (*), p value <0.01 (**) et p value <0.001 (***).

2. Résultats

Effets du traitement aux inflachromènes (ICM) sur la progression de la stéatose hépatique

Dans le but de comprendre le rôle d'HMGB1 dans la progression de la stéatose, des souris males C57Bl6 ont été mises sous HFD 60% durant six semaines avant le début du traitement avec un inhibiteur de la sécrétion d'HMGB1 (Lee et al., 2014) : les inflachromènes (ICM). A l'issue de cette période, la masse grasse (**Fig 42A**) et la tolérance au glucose (**Fig 42B**) sont identiques entre les groupes traités (ICM) et contrôles (Veh).

Après 28 jours de traitement, nous observons une tendance à la diminution de la prise de poids (Données non montrées). Cette diminution de prise de poids est associée à une diminution significative de la quantité de masse grasse (**Fig 42C**, $p=0.0200$). En revanche, la diminution de la masse grasse n'est pas associée à une amélioration de la tolérance au glucose (**Fig 42D**) ni à une diminution des ALT et AST circulantes (**Fig 42E**). Ces résultats suggèrent que le traitement aux ICM permet de limiter la prise de poids sans améliorer la tolérance au glucose. Cependant, ces résultats sont à nuancer, puisqu'en effet la prise de poids des animaux a été perturbée par le stress généré lors des injections quotidiennes et ne suit pas les prises de poids classiquement observées sur ce type de durée de régime. Afin de pouvoir réellement étudier l'effet des ICM sur la prise de poids il serait envisageable de traiter les animaux différemment en injectant éventuellement le matin de bonne heure afin de ne pas perturber leur comportement alimentaire, ou d'envisager d'injecter tous les deux jours mais sur un temps plus long (6 semaines). Avec une prise de poids normale, nous pourrions aussi évaluer les conséquences de la neutralisation d'HMGB1 par les ICM sur la progression du diabète de type II associé à l'obésité, ce qui n'a pas été vraiment possible ici, compte tenu de la prise de poids faible durant le traitement.

Cependant, le marquage de coupes de foies à l'huile rouge (**Fig 42F**) révèle une diminution de près de 50% de l'accumulation de lipides neutres dans le foie ($p=0.023$). L'analyse lipidomique (**Fig 42G**) montre une diminution significative de la quantité relative de TG ($p=0.0127$) dans le foie des animaux traités aux ICM comparativement aux animaux traités avec le véhicule. Ainsi, les ICM semblent limiter la progression de la stéatose en diminuant l'accumulation de TG dans le foie. L'analyse par qPCR de marqueurs classiques de l'inflammation comme *Adgre1*, *Ptprc*, *Tlr4*, *Rage*, *Mcp1*, *Cd11b* ou *Cd11c* (**Fig 42H**) suggère que les ICM n'auraient qu'un effet modeste sur l'infiltration des cellules immunes dans le foie.

Pris tous ensemble ces résultats suggèrent que l'inhibition de la sécrétion d'HMGB1 pourrait être une cible thérapeutique potentielle dans le traitement de l'obésité et des pathologies associées comme la stéatose hépatique.

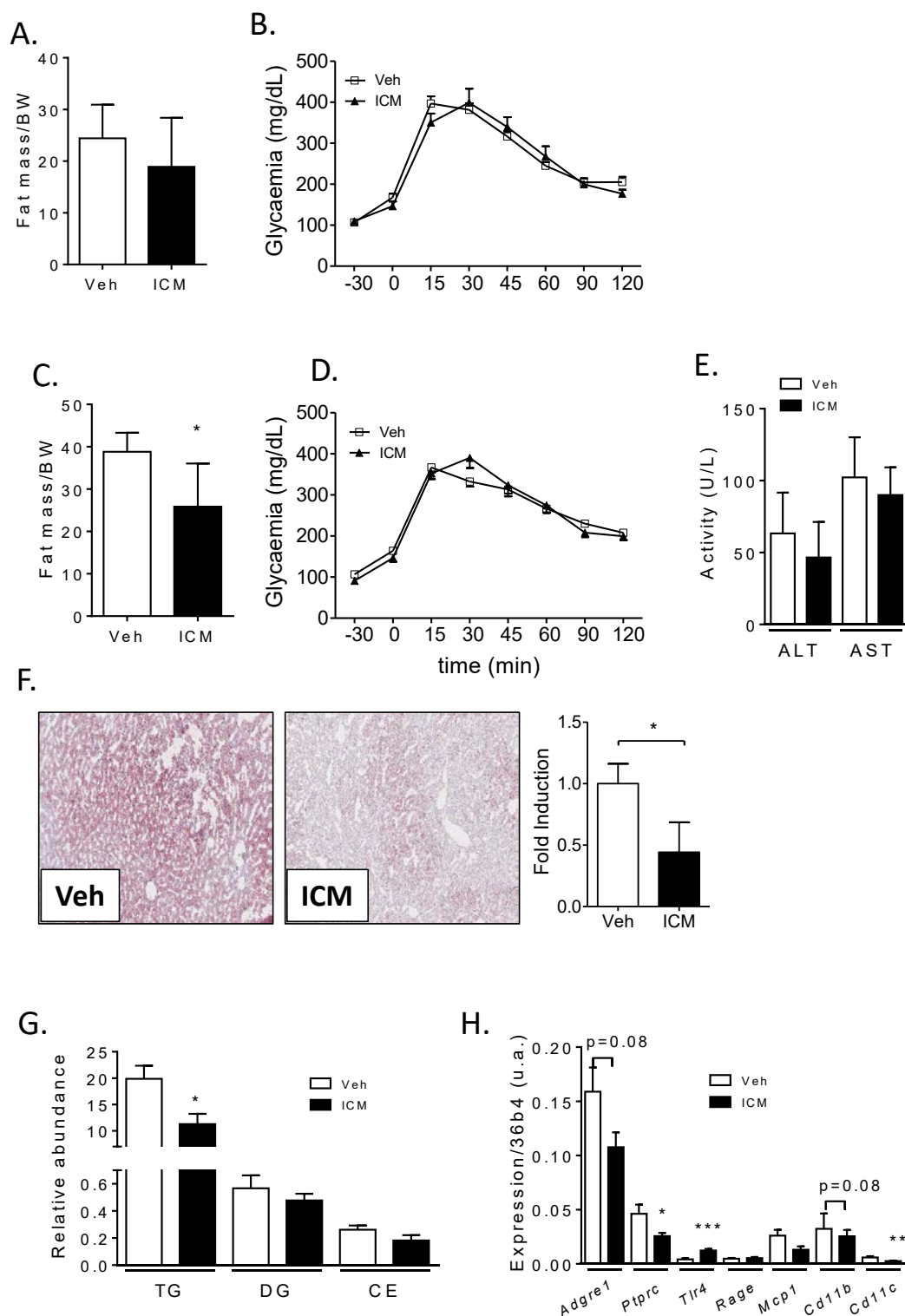


Figure 42 : Le traitement aux ICM ralentit la progression de la stéatose induite par un régime HFD60%.

Avant le début du traitement aux ICM les groupes véhicule (Veh) et traités (ICM) sont comparables en terme de masse grasse (A) et de tolérance au glucose mesurée par un OGTT (B). A l'issue du traitement la composition corporelle est mesurée par EchoMRI (C), la tolérance au glucose est analysée par un OGTT (D) et les activités des amino-transférases circulantes sont quantifiées (E). La stéatose hépatique est appréciée par un marquage à l'huile rouge (F), les espèces lipidiques hépatiques sont quantifiées par chromatographie gazeuse (G). Pour finir, l'expression des marqueurs de l'inflammation hépatique comme *adgre1*, *Ptprc*, *Tlr4*, *Rage*, *Mcp1*, *Cd11b* ou *Cd11c* est analysée par qPCR (H). ICM n=6, Veh n=8. Les données sont exprimées en moyenne \pm ESM. * $p < 0.05$.

Effets du traitement aux inflachromènes (ICM) sur la progression de la fibrose hépatique :

En plus de ce travail sur la progression de la stéatose hépatique, nous avons évalué le rôle de la forme circulante d'HMGB1 sur la progression de la NASH. Pour tester cette hypothèse, nous avons mis en place une approche reposant sur l'utilisation d'un modèle nutritionnel classique de NASH : le MCDD (*Methionine Choline Deficient Diet*) qui bien que présentant de très nombreux biais, génère rapidement (en 2 semaines) inflammation et fibrose, et permet d'établir une preuve de principe rapide sans consommation excessive d'inhibiteur. Dans ce but, nous avons traité des souris sauvages avec les ICM (10mg/kg) ou son véhicule pendant 15 jours, ici, le traitement a débuté de façon concomitante au régime MCD.

A l'issue du traitement, nous avons mesuré le ratio poids de foie sur poids de corps, comme étant un possible indicateur de la progression de la fibrose (**Fig 43A**). Ce ratio est identique entre les groupes véhicule et ICM. Dans ce contexte, ce paramètre est dépendant de l'accumulation de lipides et/ou de l'accumulation de matrice extracellulaire. Afin de quantifier les dépôts lipidiques et de matrice extracellulaire, des colorations à l'huile rouge (**Fig 43B**) et au rouge sirius sont réalisées (**Fig 43C**). Dans ce contexte, il n'y a pas de différence entre les groupes traités et contrôles ce qui suggère que dans un contexte régime MCD, l'inhibition de la sécrétion active d'HMGB1 par les ICM à un impact limité sur la progression de la fibrose.

Effet de l'inhibition de la forme circulante d'HMGB1 sur la progression de la stéatose hépatique :

Pour compléter le travail réalisé avec les ICM, un protocole expérimental basé sur l'utilisation de la glycyrrhizine (GLY) a aussi été initié en parallèle, puisque les deux molécules ont un mécanisme d'inhibition différent sur HMGB1. Pour neutraliser la forme circulante d'HMGB1, les animaux sont traités quotidiennement par injection intra-péritonéale de GLY (50mg/kg) pendant 28 jours. Pour étudier l'effet de cette inhibition sur la progression de la stéatose, les animaux sont nourris dès le début du traitement avec un régime HFD60%. A l'issue des 28 jours de traitement, le ratio poids du foie sur poids du corps n'est pas modifié par le traitement à la GLY (**Fig 44A**). En revanche nous observons une augmentation significative du marquage à l'huile rouge ($p=0,0079$) chez les animaux traités à la GLY comparativement au groupe PBS (**Fig 44B**) ainsi, et de façon inattendue, l'inhibition de la forme circulante d'HMGB1 favoriserait l'accumulation de lipides neutres dans le foie.

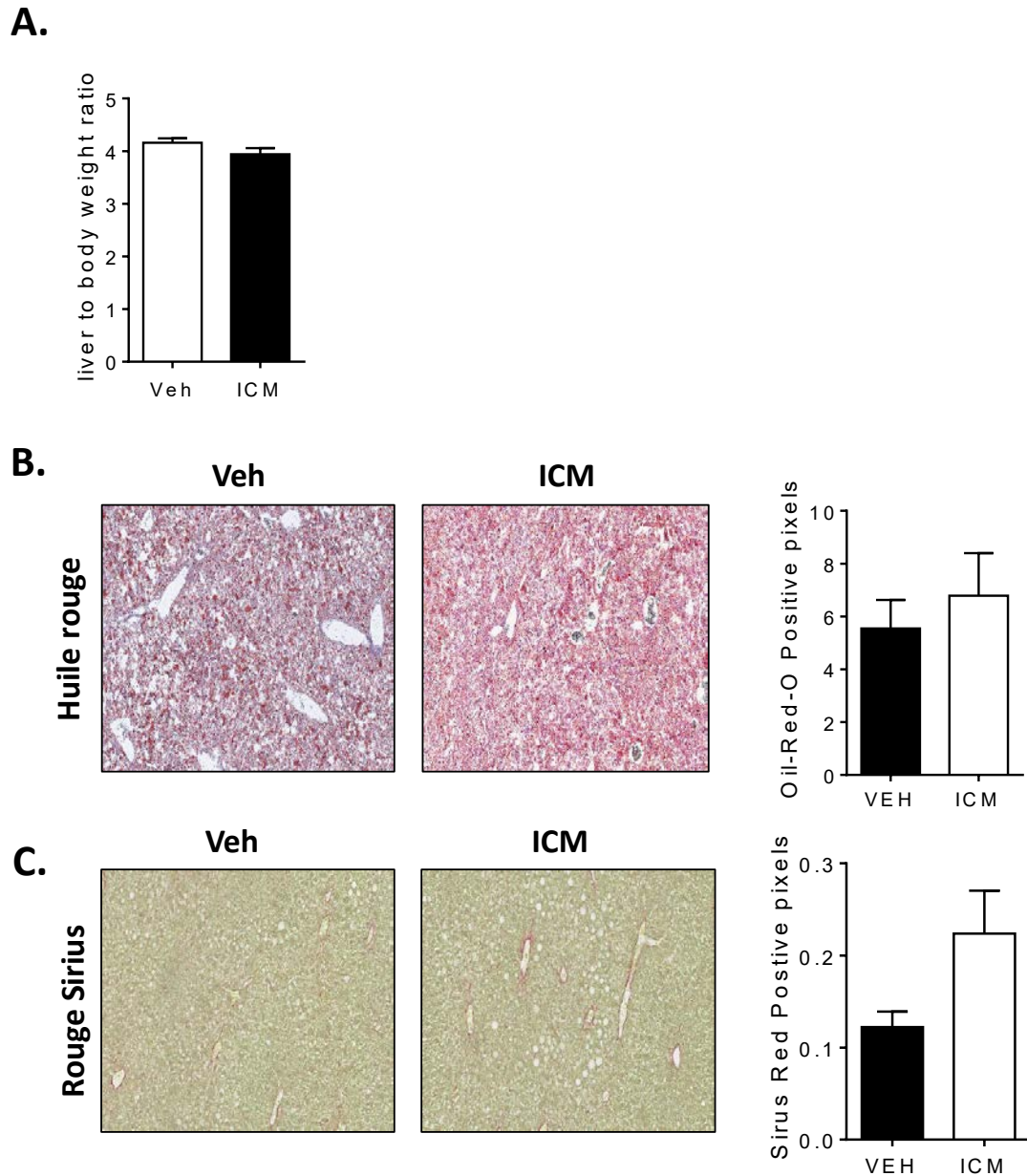


Figure 43 : Le traitement aux ICM n'a pas d'effet sur la progression de la stéatose et la fibrose induite par un régime MCDD. 15 jours après le début de traitement, le ratio poids de foie/ poids de corps est calculé dans les groupes ICM (n=10) et Veh (n=10) (A) puis la stéatose est quantifiée par un marquage à l'huile rouge, et les dépôts de collagènes sont mesurés par un marquage au rouge sirius. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm ESM.

L'analyse de l'expression génique de marqueurs classiques du stockage (**Fig 44C**), de la synthèse (**Fig 44D**) et de l'utilisation des lipides (**Fig 44E**) confirme la tendance observée précédemment. En effet, nous observons une augmentation significative de l'expression des gènes impliqués dans le stockage des lipides (**Fig 44C** : *Pparg* : $p=0.0175$, *Cd36* : $p=0.0262$ et *Cidec* : $p=0.0111$). En revanche, le traitement à la glycyrrhizine n'a pas d'effet sur l'expression de marqueurs de la synthèse (**Fig 44D**) et du catabolisme lipidique (**Fig 44E**).

Pris tous ensemble, ces résultats suggèrent que l'inhibition de la forme circulante d'HMGB1 favoriserait la progression de la stéatose sans modifier ni la synthèse ni l'utilisation des lipides.

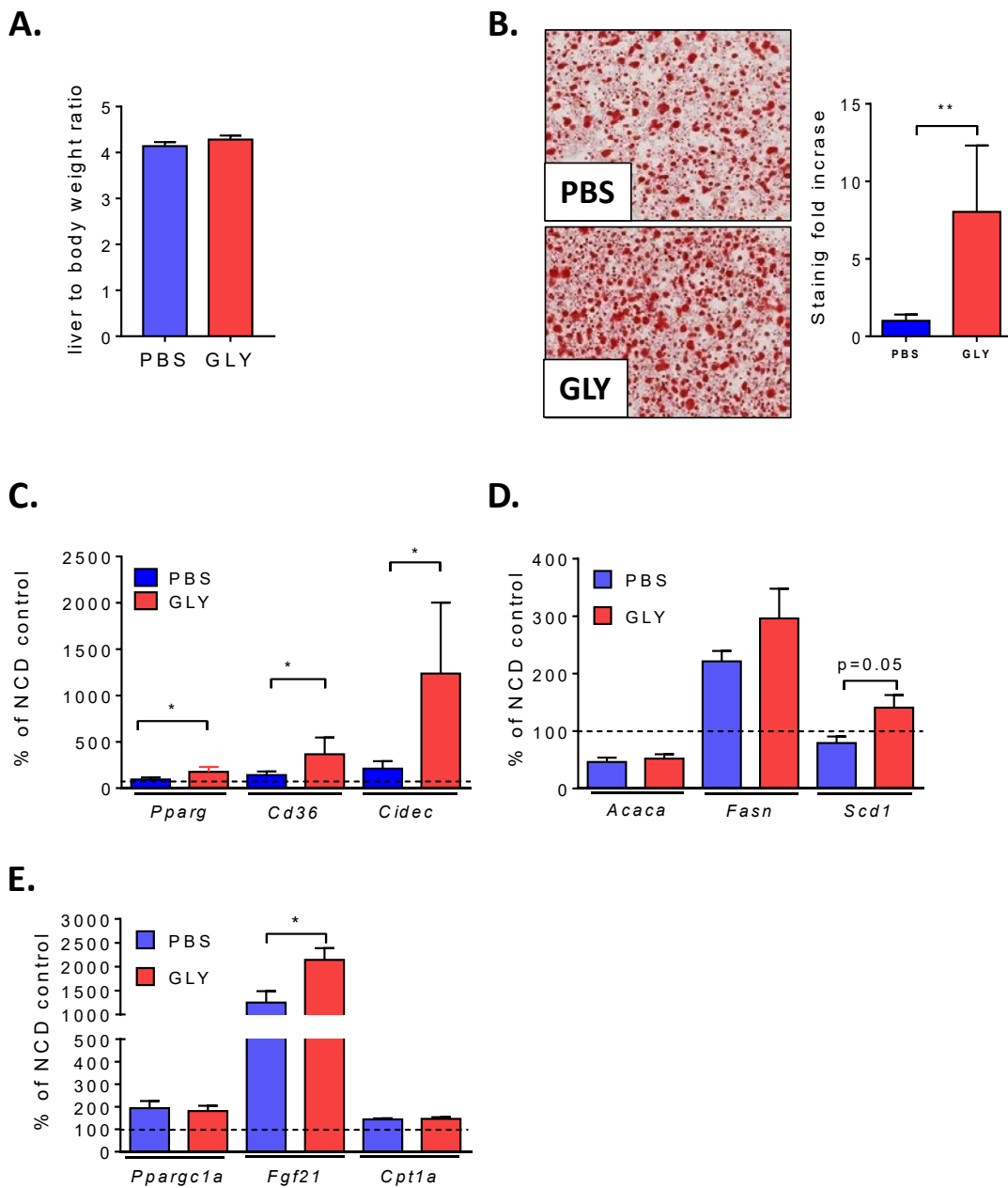


Figure 44 : Le traitement à la GLY favorise la progression de la stéatose induite par un régime HFD60%.

A la fin du traitement de 28 jours le ratio poids de foie/poids de corps est calculé (A) pour les groupes traités (GLY n=7) et témoin (PBS n=7). La stéatose hépatique est évaluée par un marquage à l'huile rouge (B). L'expression de marqueurs géniques du stockage (Pparg, Cd36 et Cidec) (C), de la synthèse (Acaca, Fasn et Scd1) (D) et de l'utilisation (Ppargc1a, Fgf21 et cpt1a) des lipides (E) est analysée par qPCR. Données exprimées en moyenne \pm ESM. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

Effets du traitement GLY sur la progression de la fibrose hépatique :

Pour étudier l'effet de cette inhibition sur le développement de la fibrose, les animaux sont nourris dès le début du traitement avec un régime CD-HFD60%. A l'issue de 28 jours, comme attendu les animaux sous régime CDHFD60% présentent une stéatose et une accumulation de MEC très sévère comparativement aux souris en chow diet, cependant, nous n'observons pas de différence dans le ratio poids de foie sur poids du corps (**Fig 45A**) ni de marquage à l'huile rouge entre les deux groupes (**Fig 45B, haut**), en revanche, il existe une tendance à la diminution du marquage au rouge Sirius (**Fig 45B bas**, $p=0.09$). Contrairement aux résultats précédents, dans un contexte de fibrose hépatique sans prise de poids, l'inhibition de la forme circulante d'HMGB1 ne semble pas avoir d'effet sur l'installation de la fibrose hépatique. Ces résultats sont confirmés par l'analyse par qPCR de marqueurs de la fibrose comme *Col1a1*, *Col3a1* ou *Acta2* (**Fig 45C**) et de l'inflammation comme *Emr1*, *Ptprc* ou *Tnfa* (**Fig 45D**) : le traitement à la GLY ne modifie pas le profil d'expression de ces gènes.

Pris tous ensemble, ces résultats suggèrent que l'inhibition de la forme circulante d'HMGB1 n'aurait aucun effet sur la progression de la fibrose hépatique

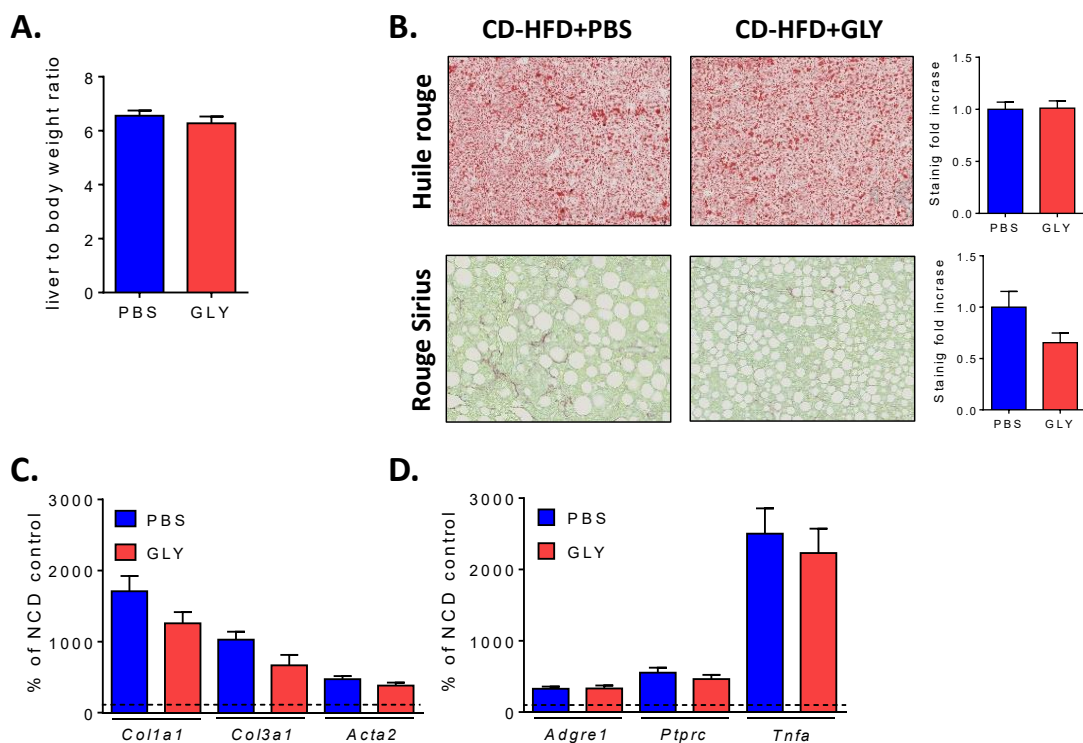


Figure 45 : Le traitement à la GLY est sans effet sur la progression de la fibrose induite par un régime CD-HFD60%.

A la fin du traitement de 28 jours le ratio poids de foie/poids de corps est calculé pour les groupes traités (GLY n=7) et témoin (PBS n=7) (A). La stéatose hépatique et la fibrose sont évaluées par un marquage à l'huile rouge (B haut) et ou rouge Sirius (B bas) respectivement. L'expression de marqueurs géniques de la fibrose (*Col1a1*, *Col3a1* et *Acta2*) (C) et de l'inflammation (*Adgre1*, *Ptprc* et *Tnfa*) (D) est analysée par qPCR. PBS n=7, GLY n=7. Données exprimées en moyenne \pm ESM. * $p<0.05$; ** $p<0.01$.

Conclusion :

Tous ces résultats suggèrent que l'inhibition de la sécrétion active de la sécrétion d'HMGB1 par les ICM pourrait jouer un rôle dans la progression de la stéatose. Cependant, ce traitement semble sans effet sur la progression de la fibrose induite par le MCD. L'inhibition de l'activité cytokinique d'HMGB1 par la GLY semble favoriser la progression de la stéatose sans effet sur la fibrose induite par le CD-HFD60%.

Les concentrations circulantes d'HMGB1, entre les groupes véhicule et ICM, sont identiques aussi bien au cours du HFD que du MCD (**Fig 46A et Fig 46B**) cependant, il semblerait que le traitement aux ICM tendrait à diminuer les concentrations plasmatiques d'HMGB1. L'absence d'effet manifeste du traitement aux ICM sur les concentrations circulantes d'HMGB1 pourrait s'expliquer en partie par la prise de poids modeste des animaux au cours de ce protocole. En effet, compte tenu des injections quotidiennes, le stress généré a probablement contribué à diminuer la prise alimentaire et donc le gain de poids. Afin de confirmer ces résultats il est envisagé de mettre en place un protocole au cours duquel les injections seront faites le matin, de manière à limiter l'effet du stress sur la prise alimentaire.

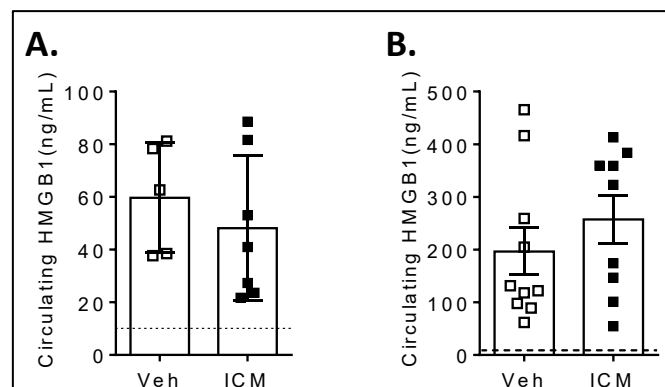


Figure 46 : Effet du traitement aux ICM sur les concentrations plasmatiques d'HMGB1.

Les concentrations plasmatiques d'HMGB1 sont mesurées par ELISA au cours du HFD60% (A) et du MCD (B). La ligne pointillée représente les concentrations circulantes mesurées chez des animaux en NCD. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm ESM.

C. Objectif III : Tissus sources d'HMGB1 circulants au cours du stress métabolique

Pour mieux comprendre la biologie de HMGB1 au cours du stress métabolique, il apparaît crucial d'identifier quel(s) tissu(s) est (sont) la principale source de HMGB1 circulante au cours d'un stress métabolique induit par un régime HFD60%. Dans ce but nous avons délété le gène *Hmgb1*, dans les cellules susceptibles d'être affectées par le stress généré par un régime hyper lipidique, au sein des tissus métaboliquement actifs (les hépatocytes : HMGB1^{ΔHep}, les adipocytes HMGB1^{ΔAdipo}, et les macrophages HMGB1^{ΔMac}). Les données préliminaires du laboratoire montrent que pendant la progression de l'obésité (et de la stéatose hépatique) au cours du régime HFD60%, les hépatocytes ne seraient pas la principale source de HMGB1 circulante puisque les souris HMGB1^{Flox} et HMGB1^{ΔHep}, sous régime, présentent le même niveau d'HMGB1 circulant (**Fig 47**).

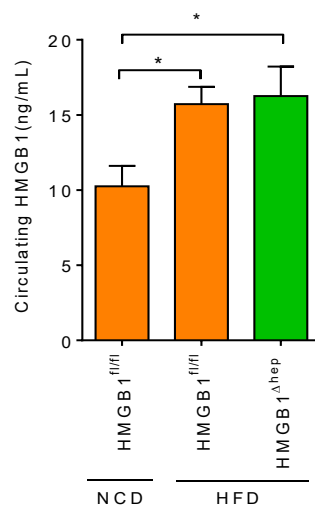


Figure 47 : Au cours du stress métabolique induit par le HFD, les hépatocytes ne sont pas la source d'HMGB1 circulant. Après 20 semaines de régime HFD60% les taux plasmatiques d'HMGB1 sont mesurés, par ELISA, chez des animaux contrôles (NCD, n=8), HMGB1^{fl/fl} sous HFD (n=10) et HMGB1^{Δhep} sous HFD (n=10). *p<0.05.

Compte tenu de ce résultat surprenant nous nous sommes concentrés sur la caractérisation des souris présentant la délétion dans les adipocytes (HMGB1^{ΔAdipo}) et les macrophages (HMGB1^{ΔMac}).

Rôle d'HMGB1 dérivé de l'adipocyte au cours du stress métabolique:

Pour tester cette hypothèse, des souris HMGB1^{fl/fl} sont croisées avec les souris AdipoCRE-ERT2 pour générer les souris HMGB1^{ΔAdipo} (**Fig 48A**). Ces animaux et leurs contrôles sont mis en régime en HFD pendant 2 mois, puis traités avec le tamoxifène pour induire la recombinaison. Deux jours après la fin de l'administration du TMX, les souris HMGB1^{ΔAdipo} présentent une diminution significative des taux circulants de HMGB1 (**Fig 48B**) par rapport aux souris HMGB1^{fl/fl}, suggérant que les adipocytes pourraient contribuer de façon significative aux taux sanguins de HMGB1. De plus, les souris HMGB1^{ΔAdipo} présentent une diminution de l'AUC suite à une charge orale de glucose (**Fig 48C et D**) ainsi qu'une diminution des marqueurs inflammatoires dans le tissu adipeux peri-gonadique déterminée par l'expression génique de marqueurs classiques de l'inflammation comme *Cd45* ou *Cd11b* (**Fig 48E**). Enfin comparativement aux souris HMGB1^{fl/fl}, les souris HMGB1^{ΔAdipo} présentent une diminution significative de la stéatose hépatique, évaluée par une coloration à l'huile rouge (**Fig 48F**). L'ensemble de ces résultats suggèrent que l'adipocyte pourrait être une des sources des taux circulants d'HMGB1, qui pourrait être à l'origine d'altérations au niveau du tissu adipeux lui-même mais aussi d'altérations des tissus périphériques comme le foie. Ce projet est en cours de développement et de nombreuses expériences sont actuellement en cours pour essayer de comprendre par quels types de mécanismes HMGB1 d'origine adipocytaire alerterait notamment l'inflammation tissulaire et l'homéostasie du glucose.

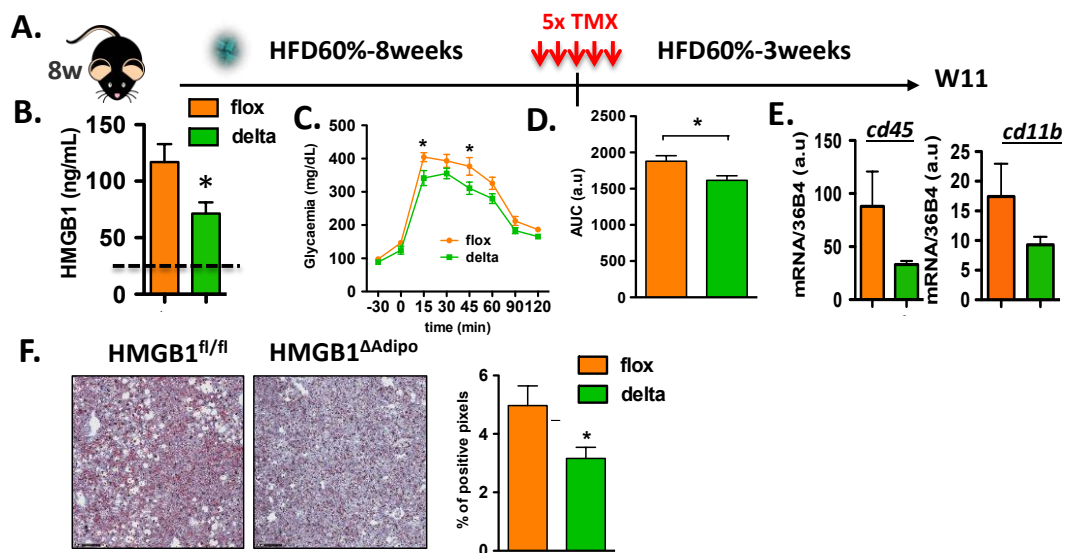


Figure 48 : La délétion d'Hmgb1 dans le tissu adipeux améliore l'homéostasie glucidique et la stéatose hépatique.

Schéma du protocole suivi (A). Deux jours après le traitement au tamoxifène (TMX) les taux circulants d'HMGB1 sont mesurés par ELISA (B). Trois semaines après le traitement au TMX les groupes HMGB1^{flox} (n=8) et HMGB1^{Δadipo} (n=8) subissent une OGTT (C et D). L'expression génique de marqueurs de l'inflammation hépatique (*Cd45* et *Cd11b*) est quantifiée par qPCR (E). La stéatose hépatique est évaluée par un marquage à l'huile rouge (Oil-Red O) (F). Les données sont exprimées en moyenne ± ESM. **p*<0.05, ***p*<0.01.

Rôle d'HMGB1 dérivé du macrophage au cours du stress métabolique:

La progression de l'obésité s'accompagne d'une inflammation de bas bruit (Sell et al., 2012) avec une activation du système immunitaire inné. Compte tenu du rôle pro-inflammatoire de la forme extracellulaire de la protéine HMGB1, et de l'activation des macrophages au cours de l'obésité, nous avons posé l'hypothèse que les macrophages pourraient être une source importante des taux circulants d'HMGB1, et que, de plus, la forme d'HMGB1 dérivée des macrophages pourrait être impliquée dans l'inflammation de bas bruit et ses effets délétères au cours du stress métabolique. Pour générer une délétion du gène *Hmgb1* dans les macrophages (HMGB1^{ΔMac}) les souris HMGB1^{fl/fl} sont croisées avec des souris LysM-CRE (Clausen et al., 1999). Afin de vérifier l'efficacité de la recombinaison, des macrophages dérivés de la moelle osseuse (BMDM) ont été générés (**Fig 49A**). L'analyse par western blot de l'expression de la protéine HMGB1 montre que la recombinaison est efficace, en effet le signal correspondant à HMGB1 dans les macrophages dérivés de souris HMGB1^{ΔMac} est presque indétectable. Pour générer un stress métabolique, les souris HMGB1^{fl/fl} et HMGB1^{ΔMac} ont été mises en HFD pour une durée de 12 semaines. Dans ce contexte, la délétion d'HMGB1 dans les macrophages ne modifie ni la tolérance au glucose (**Fig 49B**), ni la prise de poids (**Fig 49C**) ni le ratio poids de foie sur poids de corps (**Fig 49D**). En revanche, la coloration au rouge sirius (**Fig 49E, haut**) indique que la délétion d'HMGB1 dans les macrophages pourrait augmenter la fibrose hépatique, sans effet sur les dépôts de lipides neutres mesurés par une coloration à l'huile rouge (**Fig 49E, bas**). Ainsi, de façon surprenante, il semblerait que la délétion du gène *Hmgb1* spécifiquement dans les macrophages ne modifie ni la progression de l'obésité, ni le développement de la stéatose hépatique ou la sévérité du diabète de type II. En revanche, de façon très inattendue il semblerait que les tissus adipeux (données non montrées) et le foie des souris HMGB1^{ΔMac} présentent une augmentation de la fibrose suite au régime HFD.

Pour confirmer ces résultats surprenants obtenus sur un régime HFD60%, les souris HMGB1^{fl/fl} et HMGB1^{ΔMac} sont soumises à un régime favorisant le développement d'une obésité et d'un NASH à long terme, le CD-HFD45%. Après 28 semaines de régime, les souris HMGB1^{ΔMac} présentent une diminution (non significative) de 20% des taux plasmatiques d'HMGB1 comparativement aux souris HMGB1^{fl/fl} (**Fig 50B**). De plus, les souris HMGB1^{ΔMac} présentent une homéostasie du glucose améliorée (**Fig 50C-D**) avec une tendance vers une réduction de la fibrose hépatique comparées aux souris flox (**Fig 50E**).

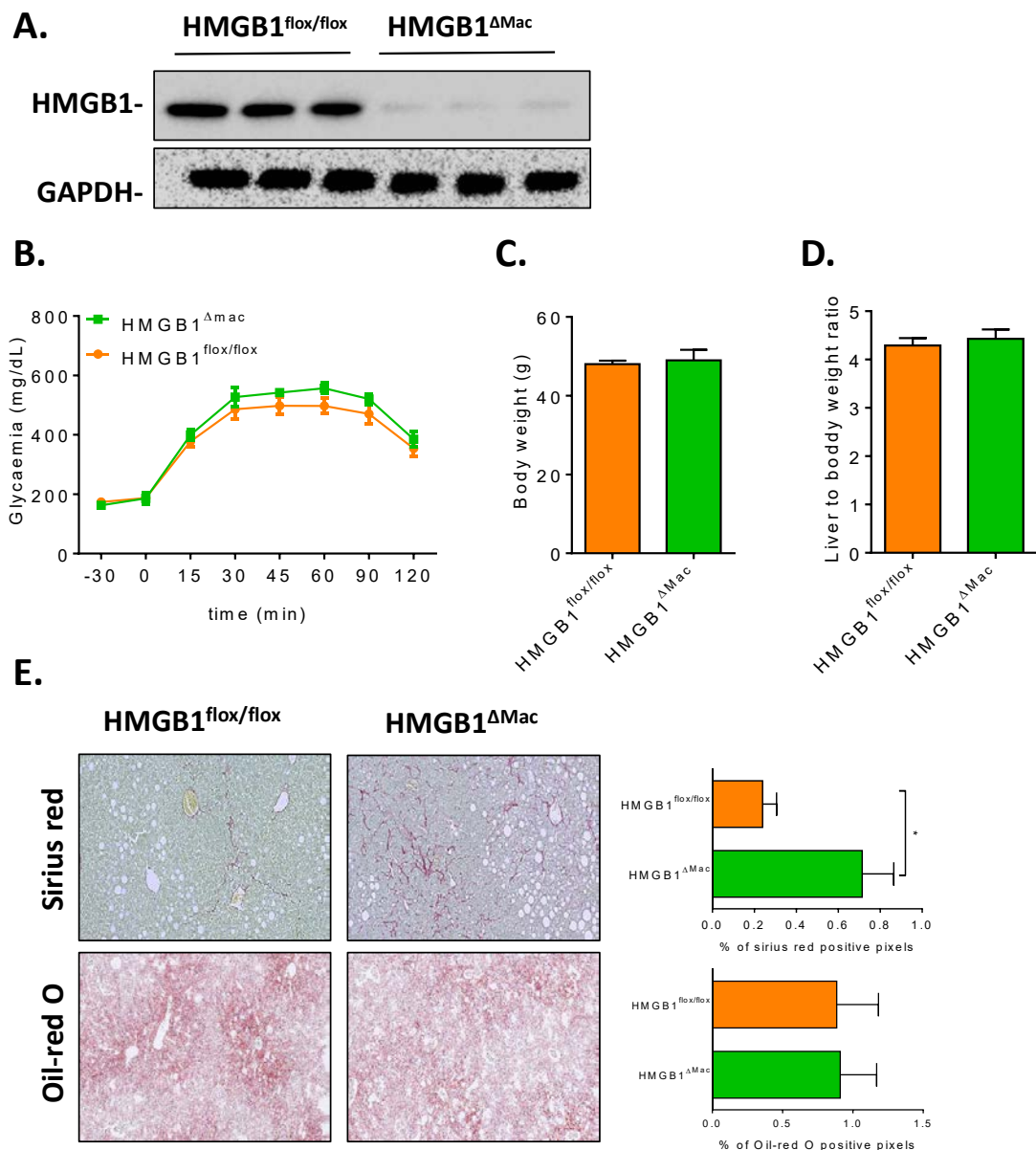


Figure 49 : La délétion d'HMGB1 dans les macrophages favorise la progression de la fibrose.

L'efficacité de la recombinaison est vérifiée sur des BMDM dérivés de souris HMGB1^{flox/flox} (n=3) et HMGB1^{ΔMac} (n=3) (A). Pour générer un stress métabolique les souris HMGB1^{flox/flox} (n=9) et HMGB1^{ΔMac} (n=7) sont nourries avec un régime HFD60% pendant 12 semaines. La tolérance au glucose est évaluée par un OGTT (B) après 12 semaines de régime. Le poids du foie (C) et le ratio poids de foie/ poids de corps (D) sont mesurés. La fibrose et la stéatose sont quantifiées suite à une coloration au rouge sirius et à l'huile rouge (Oil-re O) respectivement (E). Les résultats sont présentés en moyenne ± SEM. *p<0.05.

Globalement, ces résultats tendent à montrer que les macrophages pourraient être une source mineure de formes circulantes de HMGB1, et que cette sécrétion pourrait contribuer à des altérations du métabolisme glucidique, et du foie au cours du stress métabolique. La différence de résultats obtenus pourrait en partie être expliquée par la différence de durée des régimes. En effet, dans la première étude le HFD60% est utilisé pendant 12 semaines alors que la seconde étude utilise le CD-HFD45% pendant 28 semaines. Afin de confirmer ou d'infirmer les résultats obtenus sur la progression

de la fibrose, nous envisageons de mettre en place une étude cinétique utilisant le CD-HFD45%, au cours de laquelle la progression de la fibrose sera évaluée à intervalles de temps réguliers.

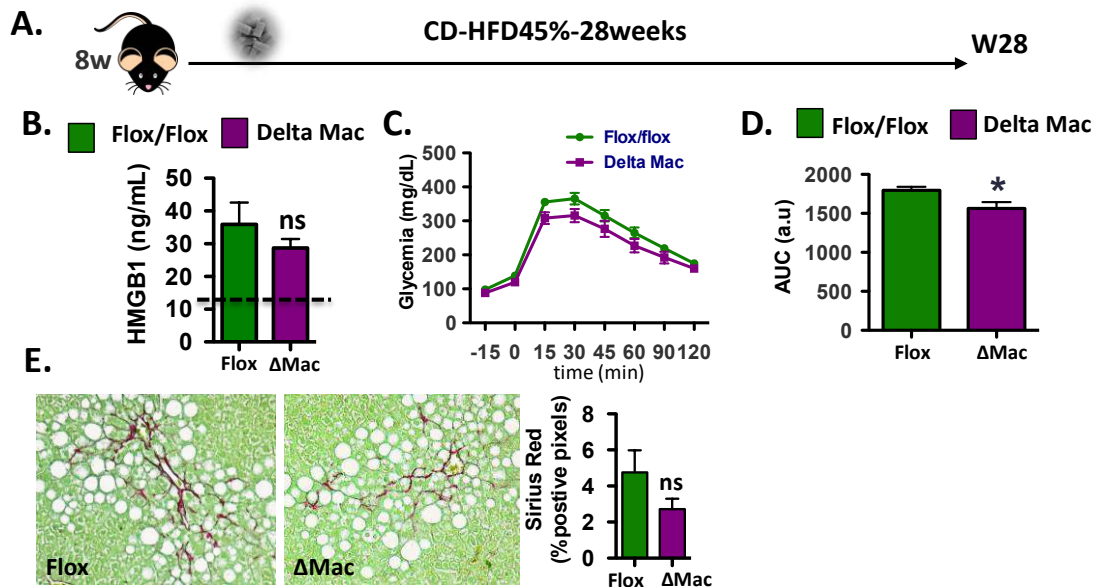


Figure 50 : La délétion d’HMGB1 dans les macrophages améliore l’homéostasie glucidique au cours de la NASH.
 Schéma du protocole (A). Les concentrations plasmatiques d’HMGB1 sont déterminées par ELISA (B). Après 28 semaines de régime, la tolérance au glucose des souris $HMGB1^{fl/fl}$ (n=11) et $HMGB1^{\Delta mac}$ (n=13) est mesurée par un OGTT (C et D). La fibrose hépatique est évaluée par un marquage au rouge sirius (E). Les données sont exprimées en moyenne \pm SEM. * $p < 0.05$.

Comme évoqué précédemment, au cours du HFD les souris $HMGB1^{\Delta Mac}$ présentent une augmentation des marqueurs inflammatoires et de la fibrose dans le foie et le tissu adipeux. Cette susceptibilité inattendue à la progression de la fibrose induite par un stress chronique comme le HFD, nous a poussés à étudier de façon plus globale la sensibilité des souris $HMGB1^{\Delta Mac}$ à la fibrogénèse sur des modèles classiquement admis dans plusieurs tissus. Dans ce but, les souris $HMGB1^{fl/fl}$ et $HMGB1^{\Delta Mac}$ ont été soumises à des modèles chimiques de fibrose du foie (CCL4, TTA) ou chirurgical : BDL (ligature des canaux biliaires) pour le foie, UJO (obstruction urétérale unilatérale) pour le rein et TAC (transverse aortic constriction) pour le cœur. Ce travail nous a permis de mettre en évidence, et de façon inattendue, qu’HMGB1 dérivé des macrophages ne jouait pas de rôle majeur dans la progression de la fibrose dans les trois organes choisis. L’ensemble de ce travail est résumé dans un manuscrit, qui bien que négatif, est très informatif pour la communauté, et est actuellement en soumission (voir article ci-après).

1 **Macrophage-Derived HMGB1 is dispensable for tissue fibrogenesis**

2

3

4 Jean Personnaz^{1*}, Enzo Piccolo^{1*}, Maxime Branchereau¹, Romain Paccoud¹, Elsa
5 Moreau¹, Denis Calise², Elodie Riant¹, Pierre Gourdy^{1,2}, Christophe Heymes¹, Robert
6 F. Schwabe³, Cédric Dray¹, Philippe Valet¹ & Jean-Philippe Pradère^{1,5}.

7

8 ¹ Institut des Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires, UMR 1048/I2MC, Institut National de la
9 Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), Université de Toulouse, Toulouse, France

10 ² UMS006, Université de Toulouse, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale
11 (INSERM) U1048, Institute of Cardiovascular and Metabolic Disease, Toulouse, France.

12 ³ Service de Diabétologie, Maladies Métaboliques et Nutrition, CHU de Toulouse, Toulouse, France

13 ⁴ Department of Medicine, Columbia University, New York, New York, USA.

14 ⁵ Corresponding author

15 **Authors contribute equally*

16

17 **Grant Support:**

18 This study is supported by grants from Inserm, Paul Sabatier University, the Agence
19 Nationale de la Recherche (ANR-17-CE14-0016/Holistic, J-P.P) and Association Française
20 d'Etude et de Recherche sur l'Obésité. J.P is supported by a scholarship from Paul Sabatier
21 University, E.P is supported by a scholarship from Agence Nationale de la Recherche (ANR-
22 17-CE14-0016/Holistic)

23 J.P and E.P contributed equally to this work as first authors

24

25 **Corresponding Author:**

26 Jean-Philippe Pradère, PhD

27 Institut des Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires, I2MC

28 Inserm-Université Paul Sabatier UMR 1048

29 BP 84225, F-31432 Toulouse Cedex 4-FRANCE

30 Tel: +33 5 61 32 56 36

31 Fax: +33 561 325 622

32 E-mail : jean-philippe.pradere@inserm.fr

33

34

35

36 **Abstract:**

37 Alarmins and damage-associated molecular patterns (DAMPs) are powerful inflammatory
38 mediators, capable of initiating and maintaining sterile inflammation during acute or chronic
39 tissue injuries. Recent evidence showed that alarmins/DAMPs may also trigger tissue
40 regeneration and repair, suggesting that they could also contribute to tissue fibrogenesis.
41 HMGB1 (High Mobility Group B1), a *bona fide* alarmin/DAMP, may be released passively by
42 necrotic cells or actively secreted by innate immune cells. HMGB1 has been linked to
43 regeneration processes but very little is known, whether macrophages are a key source of
44 HMGB1 during tissue scarring and fibrogenesis. Here, using cell-specific deletion strategy,
45 we show that surprisingly, macrophage-derived HMGB1 is not involved in tissue
46 fibrogenesis. Using well-established toxin- or surgically-induced fibrosis models *in vivo*,
47 macrophage-specific HMGB1 deletion (HMGB1^{ΔMac}), does not induce any change in fibrosis
48 progression. Compared to control HMGB1^{Flox} mice, HMGB1^{ΔMac} mice do not display any
49 modification of fibrogenesis in the liver after carbon tetrachloride or thioacetamide treatment
50 and bile duct ligation; in the kidney following unilateral ureteral obstruction; and in the heart
51 after transverse aortic constriction. Of note, even under thermoneutral housing, known to
52 exacerbate inflammation and fibrosis features, HMGB1^{ΔMac} mice do not show impairment of
53 fibrogenesis compared to control HMGB1^{Flox} mice. In conclusion, our study clearly
54 establishes that macrophage-derived HMGB1 does not contribute to tissue repair and
55 fibrogenesis.

56

57

58

59

60

61

62

63

64 **Introduction:**

65 Sterile inflammation and regeneration are two biological processes that are tightly related to
66 wound healing, but if uncontrolled could lead to scarring and fibrotic responses, contributing
67 to the long-term to organ loss of function^{1,2}. Among cells involved in these crucial functions,
68 macrophages play a central role in the clearance of dying/dead cells, and promote tissue
69 repair by secreting a broad variety of molecules, such as cytokines, chemokines or
70 alarmins¹⁻⁴, that either maintain the inflammation process and/or activate tissue
71 myofibroblasts in charge of synthesizing extracellular matrix components to promote tissue
72 architecture restoration^{2,5}. Globally in the context of wound healing, immunostimulatory
73 molecules originating either from macrophages (alarmins) or dying cells (such as damage-
74 associated molecular patterns-DAMPs) have been characterized as both pro-inflammatory
75 but also as pro-regenerating agents involved in progenitor cell proliferation and
76 differentiation^{1,3,4}, thus potentially involve during chronic tissue injury, in inflammation and
77 fibrosis processes which are now supported by several reports in heart and lungs^{6,7}. Among
78 pro-inflammatory and pro-repair agents secreted by macrophages, HMGB1 (high mobility
79 group box 1), also known for its alarmin and DAMP properties, has drawn a lot of attention as
80 it is considered as an attractive target to treat acute and chronic inflammatory diseases⁸⁻¹⁰
81 and is also envisioned as a relevant biomarker of tissue injury^{11,12} in humans. HMGB1 can
82 reach the extracellular space, once released by necrotic epithelial cells and exerts its DAMPs
83 function or when secreted by activated innate immune cells, where it mediates potent
84 inflammatory effects^{10,13}. Macrophages and other innate immune cells actively secrete
85 HMGB1 upon an inflammatory challenge (IL1 β , LPS, or TNF α) *in vitro* and *in vivo*¹⁴⁻¹⁷
86 supporting a possible role of macrophage-derived HMGB1 in tissue scarring. Recent
87 publications documented a critical role of extracellular HMGB1 in regeneration and tissue
88 repair processes in bone, muscle or liver¹⁸⁻²¹ suggesting a potential role in tissue
89 fibrogenesis. However, in liver fibrosis hepatocyte-derived HMGB1 is likely not involved in
90 fibrogenesis as shown in recent studies^{19,20}, excluding any potential role of HMGB1 as a

91 DAMP in liver scarring progression implying that non-parenchymal cells, such as
92 macrophages, could be the cellular source of HMGB1 during tissue fibrosis development.
93 To determine whether macrophage-derived HMGB1 has a determinant role in fibrosis
94 progression, we evaluated the impact of a macrophage-specific HMGB1 genetic deletion on
95 liver, kidney and cardiac fibrosis. Using very well established fibrosis models in three
96 different organs, our anatomo-pathological explorations revealed that unexpectedly,
97 macrophage-derived HMGB1 has no major role in fibrogenesis in mice.

98

99

100

101

102

103

104

105

106

107

108

109

110

111

112

113

114

115

116

117

118

119 **Materials and Methods:**

120

121 **Animals:** All experimental procedures were performed in accordance with institutional
122 guidelines for animal studies and are approved by the Ethics Committee (US006 CREFRE -
123 CEEA-122, 1710480320). Myeloid-specific deletion of HMGB1 (HMGB1^{ΔMac} were generated
124 crossing LysM-CRE^{+/-} (a generous gift from a gift from Dr. Pierre Gourdy, Toulouse France)
125 with HMGB1^{Flox} mice (a generous gift from Dr. Robert F. Schwabe, Columbia University, NY,
126 USA), littermate HMGB1^{Flox} were used as control. After randomization, 8-12 week-old males
127 were used in this study. Mice were housed under specific pathogen-free conditions at 20-
128 22°C and 50-60% humidity, with a 12h light/dark cycle and free access to water and food.
129 For thermoneutrality studies, mice were housed at 30°C in a Noroit A-Box (Noroit, France).
130 Before running any experiments, usually, mice were placed at 30°C for a 2-week period of
131 acclimation. At the time of sacrifice, tissues and organs were dissected, weighted and
132 directly snap frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C for gene expression and western
133 blot analyses. For histological analysis, tissues were fixed in 10% formalin (Sigma-Aldrich,
134 MO, USA).

135

136 **Genotyping:** DNA extraction and PCR were performed using Kapa mouse genotyping kit
137 (Kapa Biosystems, MA, USA) according to the manufacturer protocol. PCR reactions were
138 performed using following primers: LysM-CRE: 5'- ACCGGTCGATGCAACGAGTGATGAG -
139 3 (forward) and 5'-AGTGCGTTCGAACGCTAGAGC-3' (reverse), LoxP1 5'-
140 TAAGAGCTGGGTAACTTTAGGTG-3' (forward) and 5'-
141 GAAACAGACAAGCTTCAAAGCTGCT-3' (reverse), LoxP2 5'-
142 TGACAGGATACCCAGTGTAGGGG-3' (forward) and 5'-
143 CCAGAGTTTAATCCACAGAAGAAA-3' (reverse). Deletion PCR was performed using LoxP1
144 forward and LoxP2 reverse primers.

145

146 **Murine Models of Fibrosis:** Liver chemically-induced fibrosis was triggered by
147 intraperitoneal injection (i.p.) of carbon tetrachloride (CCl₄, 02671, Sigma Aldrich, MO-USA;
148 0.5 µL/g in corn oil, at a ratio of 1:3) for 8 injections or by i.p. of thioacetamide (TAA, 163678,
149 Sigma Aldrich, MO-USA) dissolved in NaCl 0.9% for 6 weeks (3 injections per week) at
150 increasing concentrations (first dose: 50 mg/kg, second dose: 100 mg/kg, third to sixth dose:
151 200 mg/kg, all following doses: 300 mg/kg) as previously described²². Cholestatic-induce
152 liver fibrosis was induced in 8-week old male mice by ligating the common bile duct for 21
153 days, as described²³. Kidney fibrosis was induced by unilateral ureteral obstruction (UUO) on
154 8 week-old mice. UUO was performed by ligating the ureter just below the renal pelvis for 7
155 days, as previously described²⁴. Transverse aortic constriction (TAC) was performed on 8-12
156 week old male mice for 28 days. After anesthesia, the transverse aorta was isolated and
157 TAC was performed by tying a waxed braided silk suture, to induce pressure overload and
158 cardiac hypertrophy as previously described²⁵. For all surgical procedures, sham-operated
159 animals underwent the same operation except the suturing of inner organs.

160

161 **Cardiac Function assessment:** The left ventricle dimensions were determined using
162 echocardiography and TM mode acquisition from the parasternal short axis view at the level
163 of the papillary muscles using a Vivid7 echograph and a 14 MHz transducer (i3L,
164 GEHealthcare, UK). Images were transferred and analyzed offline with EchoPAC
165 (GEHealthcare, UK).

166

167 **Plasma analysis:** AST and ALT levels were determined in plasma by the Phenotypage-
168 CREFRE facility using a Pentra400 biochemical analyzer (Horbia Medical, Japan). HMGB1
169 circulating levels were assessed by ELISA (ST51011, IBL International, Switzerland)
170 according to the manufacturer guidelines.

171

172 **Bone marrow-derived macrophages:** Bone marrow cells were obtained by flushing the
173 cavity of femurs and tibia of HMGB1^{Flox} and HMGB1^{ΔMac} mice (8 week-old) in sterile DMEM

174 supplemented with 10% Fetal Calf Serum. Cells were filtered on a 42µm cell-strainer, and
175 after erythrocyte lysis, harvested cells are plated and treated with 10ng/mL recombinant
176 murine macrophage colony stimulating factor (M-CSF) (PeproTech, Inc, NJ, USA) for 7 days.
177 The medium was renewed every 2 days with DMEM 10% FCS with 10 ng/mL M-CSF.

178

179 **Immunocytofluorescence:** Bone marrow-derived macrophages were fixed after 7 days of
180 differentiation, with 10% Formalin. Cells were permeabilized with 0,1% Triton and staining
181 was performed with a primary antibody against HMGB1 (1:200, ab18256, Abcam,
182 Cambridge, UK) and Alex Fluor 546-conjugated secondary antibody (1:800, A11010, Life
183 Technologies, CA, USA). Nuclei were stained with DAPI (Sigma-Aldrich, MO, USA).
184 Confocal microscopy was performed on an LSM 780 confocal laser microscope (Zeiss,
185 Germany) using a 63x oil immersion lense.

186

187 **Stromal Vascular Fraction preparation:** Mice were anesthetized with pentobarbital (50
188 mg/kg), then perfused with PBS to wash out blood from tissues. Mice were euthanized and
189 tissues were harvested. Liver and lungs were digested with collagenase D (2,5mg/mL,
190 Roche Diagnostics, IN, USA) under agitation for 20 min at 37°C. After centrifugation at 600g
191 for 10 min, stromal cells were separated in 30% percoll. After centrifugation at 600g for 15
192 min, the pellet containing stromal cells were incubated with erythrocyte lysis buffer for 10 min
193 followed by another centrifugation (600g, 10 min) and resuspension in PBS.

194

195 **Western blotting:** Tissues were homogenized in RIPA buffer (TRIS 20 mM, NaCl 150 mM,
196 EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, TRITON X100 1%, Tetra-Sodium Pyrophosphate 2.5 mM, B-
197 Glycerophosphate 1 mM, Sodium orthovanadate 1 mM) containing proteases and
198 phosphatases inhibitors (Sigma-Aldrich, MO, USA) using Precellys sample lyzer (Bertin
199 Technologies, France). Western blots were performed using standard procedures with using
200 antibodies against HMGB1 (1: 1000, ab18256, Abcam, UK), α-SMA (1: 1000, ab5694,

201 Abcam, Cambridge, UK), GAPDH (1: 2000, ab181602, Abcam, UK), were used as a loading
202 control.

203

204 **Gene expression:** RNA were extracted using GenJET RNA purification kit
205 (ThermoScientific, MA, USA) and DNase treatment (Qiagen, Germany). After dosage with
206 Xpose (Trinean, Belgium) reverse transcription was performed using High Capacity cDNA
207 reverse transcription kit (Applied Biosystem, CA, USA) according to the manufacturer
208 protocol. Real-Time -qPCR was performed with indicated primer pairs gene expression is
209 normalized using *Rplp0* reference gene expression. Primer sequences were as follows:

210 *Acta2*, 5' -GTCCCAGACATCAGGGAGTAA-3' (forward) and 5' -
211 TCGGATACTTCAGCGTCAGGA-3' (reverse), *Col1a1*, 5' -
212 TGTGTGCGATGACGTGCAAT-3' (forward) and 5' -GGGTCCCTCGACTCCTACA-3'
213 (reverse), *Col3a1*, 5' -AAGGCGAATTCAAGGCTGAA-3' (forward) and 5' -
214 TGTGTTTAGTACAGCCATCCTCTAGAA-3' (reverse), *Emr1*, 5' -
215 TGACAACCAGACGGCTTGTG-3' (forward) and 5' -GCAGGCGAGGAAAAGATAGTGT-3'
216 ' (reverse), *Rplp0*, 5' -AGTCGGAGGAATCAGATGACGAT-3' (forward) and 5' -
217 GGCTGACTTGGTTGCTTTGG-3' (reverse).

218

219 **Histology and immunohistochemistry:** 10% Formalin-fixed samples were paraffin
220 embedded and sliced at 5µm. For Picrosirius red staining, sections were dipped for 1.5h in
221 acid picric containing 1% Direct red 80 (365548, Sigma-Aldrich, MO, USA) and 0.5% fast
222 green (F7258, Sigma-Aldrich, MO, USA). Immunohistochemistry was performed using anti-
223 mouse α-SMA (ab5694, Abcam, UK) followed a biotinylated goat anti-rat antibody (BA-9400
224 Vector laboratories, CA, USA) and streptavidin-HRP (DY998, R&D systems, MN, USA) with
225 DAB as substrate (11718096001, Sigma-Aldrich, MO, USA). Stained slides were scanned
226 using a Nanozoomer scanner (Hamamatsu Photonics, Japan). Quantification was performed
227 using Photoshop (Adobe Systems, CA, USA) software.

228 **Statistics:** Analyses are performed using GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, CA,
229 USA). All data are expressed as mean \pm SEM, except otherwise indicated, statistical
230 significance was determined by Mann & Withney or two-way ANOVA tests. P values <0.05
231 were considered significant (*p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001; ****p<0,0001).

232

233

234

235

236

237

238

239

240

241

242

243

244

245

246

247

248

249

250

251

252

253

254

255

256 **Results:**

257

258 **Liver HMGB1 levels are upregulated during liver fibrosis.**

259 As HMGB1 is thought to be a determinant player in fibrogenesis, we first characterized the
260 expression levels of HMGB1 during fibrosis progression in the liver. Using two models of
261 chemically (CCL₄) or surgically (BDL)-induced liver fibrosis, we show that HMGB1 protein
262 levels were strongly up-regulated in fibrotic livers compared to control livers (**Fig1A-B**)
263 suggesting a possible role of HMGB1 during fibrogenesis. To determine whether
264 macrophage-derived HMGB1 could be responsible for fibrosis progression, we generated
265 mice specifically deleted for *Hmgb1* gene in macrophages (HMGB1^{ΔMac}) by crossing LyzM-
266 Cre²⁶ and HMGB1 floxed transgenic mice²⁷. Beside getting a clear recombination in the
267 *hmg1* gene locus (**Suppl Fig1A-B**), western blotting analysis demonstrated an efficient
268 deletion of HMGB1, *in vivo* in naïve peritoneum macrophages or in resident macrophages
269 from stromal vascular fraction of liver or lungs with 88, 55 and 98% of deletion respectively
270 (**Fig1C-E**) and *in vitro* in bone marrow-derived macrophages with 99% deletion using
271 immunoblotting or immunocytofluorescence (**Fig1F**). Upon basal conditions, compared to
272 HMGB1^{Flox}, HMGB1^{ΔMac} mice did not show any detectable differences of fibrosis features
273 with comparable protein levels of α-SMA protein as measured by immunoblotting (**Fig1G**)
274 and normal picosirius red staining surrounding liver vessels and staining of vascular smooth
275 muscle cells (**Fig1H-I**).

276

277 **HMGB1^{ΔMac} mice do not have an increased liver fibrogenesis after CCL₄ treatment.**

278 To determine whether macrophage-derived HMGB1 is playing a key role in fibrogenesis, we
279 first studied liver fibrosis. In this purpose, HMGB1^{Flox} and HMGB1^{ΔMac} mice were treated with
280 eight intraperitoneal injections of carbon tetrachloride (CCL₄) and were sacrificed two days
281 after the last injection. *Hmgb1* gene deletion has been carefully monitored using deletion
282 PCR on whole liver DNA extract from both HMGB1^{Flox} and HMGB1^{ΔMac} mice (**Suppl Fig1C**).
283 Following CCL₄ treatment, HMGB1^{Flox} mice exhibited a significant accumulation of collagen

284 compare to oil-treated mice as shown by picrosirius red staining (**Fig2A**), but no differences
285 were detected between HMGB1^{Flox} and HMGB1^{ΔMac} mice. Similarly, HMGB1^{Flox} and
286 HMGB1^{ΔMac} mice displayed comparable levels of α-SMA immunostaining (**Fig2B**). Moreover,
287 there were no differences in α-SMA protein levels (**Fig2C**) as well as similar mRNA
288 expression levels of fibrogenic and proinflammatory markers *Acta2*, *Col1a1*, *Col3a1* and
289 *Emr1* (**Fig2D**). Finally, while CCL₄ treatment induced a pronounced liver injury compared to
290 oil-treated mice, there were no differences in serum ALT or AST levels between HMGB1^{Flox}
291 and HMGB1^{ΔMac} mice (**Fig2E**).

292

293 **HMGB1^{ΔMac} mice do not display increased TAA-induced liver fibrosis.**

294 To confirm these findings in a second well-established model of chemical-induced liver
295 fibrogenesis, we next challenged mice using thioacetamide (TAA). HMGB1^{ΔMac} and
296 HMGB1^{Flox} mice were treated with 18 intraperitoneal injections of TAA. As performed on
297 CCL₄ model, *Hmgb1* gene deletion was carefully monitored using deletion PCR on whole
298 liver DNA extract from both HMGB1^{Flox} and HMGB1^{ΔMac} mice (**Suppl Fig1D**). Similar to our
299 results obtained in the CCL₄ model, we did not detect any differences between HMGB1^{Flox}
300 and HMGB1^{ΔMac} mice. After TAA treatment, HMGB1^{Flox} mice exhibited a pronounced
301 deposition of fibrillar collagen and α-SMA staining compared to saline-treated mice but the
302 increase in fibrotic markers was identical between HMGB1^{Flox} and HMGB1^{ΔMac} mice (**Fig3A-**
303 **B**). In addition, α-SMA (**Fig3C**) protein levels, as well as mRNA expression of classical
304 fibrosis markers such as *Acta2*, *Col1a1*, *Col3a1*, and *Emr1* (**Fig3D**) and serum levels of liver
305 injury markers (**Fig3E**), were comparable in HMGB1^{Flox} and HMGB1^{ΔMac} mice subjected to
306 TAA treatment.

307

308 **HMGB1^{ΔMac} mice do not have an increased hepatic fibrogenesis after BDL.**

309 To corroborate these findings, we use a complementary model of cholestatic liver injury, bile
310 duct ligation (BDL). As done previously, *Hmgb1* gene deletion was carefully monitored using
311 deletion PCR on whole liver DNA extract from both HMGB1^{Flox} and HMGB1^{ΔMac} mice (**Suppl**

312 **Fig1E**). Twenty-one days after BDL, HMGB1^{Flox} mice displayed severe hepatic fibrosis as
313 shown by picrosirius red staining but again no differences were detected between HMGB1^{Flox}
314 and HMGB1^{ΔMac} mice (**Fig4A**). Expression of α-SMA was also increased in HMGB1^{Flox} mice
315 assessed by immunohistochemistry and immunoblotting but with no differences compared to
316 HMGB1^{ΔMac} mice (**Fig4B-C**). mRNA expression of fibrogenic markers *Acta2*, *Col1a1*, *Col3a1*,
317 and inflammatory marker *Emr1*, as well as serum ALT and AST levels, were also similar in
318 HMGB1^{Flox} and HMGB1^{ΔMac} mice (**Fig4D-E**).

319

320 **HMGB1^{ΔMac} mice do not exhibit an increased kidney fibrosis after UUO.**

321 As the results collected on three relevant injury models unexpectedly showed no effects of
322 HMGB1 deletion on liver fibrosis, we next tested whether the role of macrophage HMGB1 in
323 kidney fibrosis, where fibrotic mechanisms are slightly different compared to liver. For this
324 purpose, we employed a classical model of tubulointerstitial fibrosis induced by unilateral
325 ureteral obstruction (UUO)²⁴. As performed in liver, *Hmgb1* gene deletion was carefully
326 monitored using deletion PCR on whole kidney DNA extract from both HMGB1^{Flox} and
327 HMGB1^{ΔMac} mice (**Suppl Fig1F**). Seven days after UUO, HMGB1^{Flox} mice displayed typical
328 fibrosis features with a drastic deposition of fibrillar collagen and myofibroblast activation
329 (**Fig5A-B**) compared to sham-operated mice, as determined by immunohistochemistry. But
330 similarly to liver fibrogenesis models, no differences were detected between HMGB1^{Flox} and
331 HMGB1^{ΔMac} mice in UUO induced-kidney fibrosis progression. Moreover, α-SMA protein
332 levels (**Fig5C**), as well as mRNA expression of fibrogenic genes *Acta2*, *Col1a1*, *Col3a1* and
333 *Emr1* (**Fig5D**), were comparable between HMGB1^{Flox} and HMGB1^{ΔMac} mice in the harvested
334 kidney following UUO.

335

336 **HMGB1^{ΔMac} mice do not display an increased cardiac fibrosis after TAC.**

337 In addition to liver and kidney, we finally assessed the impact of HMGB1 deletion in
338 macrophages on fibrosis progression in the heart as a third tissue, using transverse aortic
339 constriction (TAC) as a well-established and clinically relevant model of cardiac fibrosis²⁸. As

340 performed previously, *Hmgb1* gene deletion was carefully monitored using deletion PCR on
341 whole heart DNA extract from both HMGB1^{Flox} and HMGB1^{ΔMac} mice (**Suppl Fig1G**). Twenty-
342 eight days after TAC, HMGB1^{Flox} mice displayed pronounced impairments of cardiac function
343 such as left ventricular end-systolic and end-diastolic dimension (**Table1**) compared to sham-
344 operated animals, accompanied with a strong collagen deposition (**Fig6A**). But once again,
345 HMGB1^{Flox} and HMGB1^{ΔMac} mice subjected to TAC showed a similar extent of functional
346 alterations and extracellular matrix accumulation determined by picrosirius red staining or α-
347 SMA immunohistochemistry and immunoblotting (**Table 1 & Fig6A-C**). In addition, similar
348 levels of mRNA expression of classical fibrogenic markers such as *Acta2*, *Col1a1*, and
349 *Col3a1 mRNA*, and inflammatory marker *Emr1 mRNA* were detected using real-time qPCR
350 in operated HMGB1^{Flox} and HMGB1^{ΔMac} mice (**Fig6D**).

351

352 **Thermoneutral housing has no incidence on fibrosis progression in HMGB1^{ΔMac} mice**
353 **compared to HMGB1^{Flox} mice.**

354 In the recent years, several striking studies have demonstrated that for rodent models, as
355 opposed to thermoneutral housing (30-32°C), room temperature housing (20-22°C) initiates
356 and maintains a chronic cold stress that dramatically impairs physiology^{29,30} and immune
357 response (e.g to inflammatory stimulus)²⁹⁻³¹. As a severe alteration of immune responses
358 has pronounced consequences on fibrosis progression^{32,33}, we hypothesized that
359 thermoneutral housing, rather than room temperature housing performed so far, might be a
360 more relevant context to evaluate the impact of macrophage-derived HMGB1 deletion on
361 fibrosis development. For this purpose, after two weeks of acclimation at 30°C, HMGB1^{Flox}
362 and HMGB1^{ΔMac} mice were subjected to two fibrosis models: BDL-induced liver fibrosis and
363 UUU-induced kidney fibrosis. As done at room temperature conditions, *Hmgb1* gene deletion
364 has been carefully monitored using deletion PCR on whole liver or kidney DNA extract from
365 both HMGB1^{Flox} and HMGB1^{ΔMac} mice (**Suppl Fig1H-J**). As expected, we found that
366 thermoneutral compare to room temperature housing affected global mouse physiology, and
367 remarkably HMGB1 circulating levels are higher in mice housed at 30°C compare to 20°C

368 housing conditions (**Suppl Fig2A**). In addition, serum ALT and AST levels (**Suppl Fig2B-C**)
369 and liver fibrosis (**Suppl Fig2D**) were increased when mice are housed at 30°C compared to
370 20°C suggesting a higher hepatocyte turnover at 30°C. In both models and similar to what
371 we observed at room temperature, HMGB1^{Flox} mice exhibited a severe deposition of collagen
372 and myofibroblast activation compared to sham-operated animals (**Fig7A-D**). But similar to
373 room temperature housing, HMGB1^{Flox}, and HMGB1^{ΔMac} mice displayed the same extent of
374 fibrosis progression induced by either BDL or UUO procedures determined by picrosirius red
375 staining and immuno-detection (**Fig7A-D**). Expression of α -SMA using immunoblotting and
376 mRNA expression of fibrogenesis markers as *Acta2*, *Col1a1* and *Col3a1* and inflammatory
377 marker *Emr1* displayed similar levels after BDL and UUO between HMGB1^{Flox} and
378 HMGB1^{ΔMac} mice (**Fig7E-F & G-H**). Finally, compared to sham-operated mice, BDL induced
379 a pronounced liver injury (**Suppl Fig3A-B**) but there were no differences in serum ALT or
380 AST levels between HMGB1^{Flox} and HMGB1^{ΔMac} mice. In parallel, BDL and UUO procedures
381 provoked a marked increase of circulating levels of HMGB1 (**Suppl Fig3C**), albeit not
382 significant, compare to sham-operated animals, and operated HMGB1^{Flox} and HMGB1^{ΔMac}
383 mice displayed comparable amount of serum HMGB1 levels (**Suppl Fig3C**). Altogether these
384 results suggest that, despite a stronger level of fibrosis compared to room temperature
385 conditions, thermoneutral housing did reveal any role of macrophage-specific HMGB1 in
386 fibrosis progression. Therefore, conclusions drawn from room temperature experiments were
387 fully confirmed under thermoneutral conditions.

388

389

390

391

392

393

394

395

396 **Discussion:**

397 In the expanding field of sterile inflammation biology, many open questions remain in
398 regards to the effects of DAMPs in acute inflammation, tissue regeneration, scarring, and
399 fibrosis. Here, using conditional deletion of HMGB1 protein specifically in macrophages, we
400 clearly demonstrate that macrophage-derived HMGB1 protein does not play a key role in
401 fibrogenesis in three different organs using a wide range of well-established models. In
402 contrast, a recent study by Ge et al, using macrophage-specific genetic ablation (LysM-CRE)
403 or neutralization strategies demonstrate that macrophage and hepatocyte-derived HMGB1
404 rather participates in liver fibrosis³⁴. Employing cell-specific knockout of HMGB1 in
405 macrophages *in vivo*, our report questions the contribution of a prototypical DAMP or pro-
406 inflammatory cytokine HMGB1 in the pathogenesis of fibrosis. The opposite conclusions of
407 both studies might be due to the use of different mice. While Ge et al. used a conditional
408 deletion of HMGB1 exon 2-3, we employed mice expressing floxed exons 2-4. It is hard to
409 fully explain this obvious discrepancy but the presence of the exon 4 in the study of Ge et al
410 may be a possible caveat as bioinformatics analysis tend to demonstrate the presence of an
411 active ORF even after CRE recombination, suggesting that exon 4 and 5 are still possibly
412 translated and biologically active. These two different floxing strategies resulted in opposite
413 results on HMGB1 and mitochondrial quality control and autophagy mechanism *in vivo*^{27,35},
414 but similar outcomes in liver cancer progression^{19,36} without really finding a rational molecular
415 explanation³⁷⁻³⁹. Further studies will be needed to decipher why both transgenic lines lead to
416 similar conclusions in certain contexts and to opposite conclusions in specific settings.

417 The present work is clearly questioning the potential role of macrophage-derived
418 HMGB1 and its relevance *in vivo*. Numerous reports have been published in recent years,
419 showing *in vitro* that innate immune cells might actively secrete HMGB1, after an
420 inflammatory challenge such as LPS. *In vivo*, few reports suggesting that *macrophage-*
421 *derived* HMGB1 may be involved in acute inflammation diseases like in colon or lungs^{40,41}.
422 But most of these *in vivo* studies used pharmacological agents such as ethyl pyruvate that
423 has been identified as a potential blocker of the nuclear to cytoplasmic translocation⁴⁰

424 typically observed in macrophages cell lines. In the meantime, other publications have
425 demonstrated that epithelial cells might are capable of an active secretion of HMGB1 such as
426 adipocytes, skin fibroblasts or colon cancer cells⁴²⁻⁴⁴ implying that ethyl pyruvate may also
427 prevent active secretion in these epithelial cells and would then not be specific of
428 macrophages, undermining conclusions drawn from previous *in vivo* works using ethyl
429 pyruvate. In this context, the *in vivo* role of macrophage-derived HMGB1 is still elusive, and
430 only cell-specific deletion strategy might help to decipher precisely which processes are
431 driven by macrophage-derived HMGB1. To the best of our knowledge, only a few studies
432 have been already published using a genetic model of macrophage-specific invalidation of
433 HMGB1. Among them, the work from Huebener et al demonstrated using two different CRE
434 lines (MX1-Cre and VAV1-Cre) targeting bone marrow derived-cells, that circulating levels of
435 HMGB1 were severely blunted after an LPS challenge *in vivo*⁴⁵, meanwhile Yanai et al, using
436 LysM-Cre deleter targeting more specifically macrophages, showed no changes in HMGB1
437 circulating levels after the same LPS stimulation⁴⁶. Taken together these results tend to
438 suggest that macrophages might be marginally involved, as opposed to *in vitro* studies, in
439 active secretion process of HMGB1 after an LPS challenge questioning the relevance of
440 HMGB1 active secretion by macrophages *in vivo*. It is possible that LPS is substantially
441 different from stimuli encountered by macrophages during fibrogenic challenges such as
442 CCL₄ injections. But while we noted that HMGB1 circulating and liver levels were increased
443 during all fibrogenic models used in our study we did not find any change in plasma (**Suppl**
444 **Fig4**), and livers (not shown) harvested from HMGB1^{ΔMac} compare to HMGB1^{Flox} mice
445 supporting one more time a marginal contribution of macrophage-derived HMGB1 in the
446 whole circulating or local pool after CCL₄ injection.

447 Despite being the best possible approach *in vivo*, HMGB1 cell-specific deletion may
448 also have potential caveats that need to be considered. As now well established, HMGB1 is
449 within the cell, an abundant nuclear factor conserved among all eukaryotic cells, which
450 regulates chromatin conformation and gene regulation and once outside the cells, a danger
451 signal promoting inflammatory reactions. By deleting HMGB1 in the macrophages, we *de*

452 *facto* blunted both intra and extra-cellular pools of HMGB1. And in their report, Yanai et al
453 stated that HMGB1 macrophage-specific deletion may have altered intracellular homeostasis
454 and notably autophagy pathways⁴⁰, which would have serious consequences on
455 macrophages physiology, polarizing them towards a pro-inflammatory phenotype with
456 notably a higher capacity to secrete IL1 β and IL-18 and promoting eventually macrophage
457 cell death⁴⁰. In this context, we cannot rule out that deletion of *Hmgb1* gene in macrophages
458 may have altered macrophages function in our settings. Thus, we could hypothesize that
459 generating such confounding factors (modifying macrophage global function and survival)
460 could prevent us to properly assess the sole HMGB1 extracellular function *in vivo* and
461 possible impact on fibrogenesis. Only sophisticated genetic strategies could help to
462 discriminate between the role in macrophages of HMGB1 as a nuclear factor in one hand
463 and as a secreted factor in the other hand.

464 Despite unexpected results on macrophage-derived HMGB1 and fibrogenesis, our
465 study does not question the overall role of DAMPs in fibrogenesis, a lot of publications
466 demonstrate using well-characterized DAMPs receptors, belonging to the PRR family, that
467 DAMPs and sterile inflammation players are definitely driving tissue scarring and
468 fibrogenesis. Reports addressing potential HMGB1 receptors involvement in fibrogenesis
469 clearly demonstrate that PRRs such as TLRs or RAGE are causally connected to tissue
470 scarring in lungs, kidney, heart or liver. TLR4 knockout mice are protected against
471 fibrogenesis upon chemically or surgically-induced fibrosis in liver⁴⁷, heart⁴⁸, and lungs⁴⁹,
472 TLR2 knockout mice are preserved towards cardiac fibrosis⁵⁰, and TLR9 has been involved
473 in liver fibrosis^{51,52}. And RAGE has also been connected to fibrogenesis in lungs^{53,54} and
474 kidneys⁵⁵. Thus, there is a consistent body of literature demonstrating that PRRs such as
475 TLRs or RAGE are involved in fibrogenesis, therefore suggesting that DAMPs or other types
476 of ligands besides HMGB1, may exert a profibrotic activity⁵⁶. In this context, HMGB1 certainly
477 acts as DAMP in certain conditions or as an alarmin in other conditions depending on the cell
478 source. Considering the complexity of sterile inflammation response, with such a variety of
479 ligands and receptors, one could hypothesize that initiation of an inflammatory or pro-fibrotic

480 response may depend on an unknown threshold of necrosis, type of tissue injury combined
481 with micro-environmental conditions- not yet identified- which could affect and influence the
482 channeling towards no response, or inflammatory and/or fibrotic response. Further *in vivo*
483 work is needed, using sophisticated genetic tools, to clearly assess how on a molecular level,
484 how nuclear and secreted HMGB1 may drive regeneration, inflammation or fibrosis and to
485 identify which cell source is specifically involved in each biological pathway.

486

487 **Acknowledgments:**

488 The authors would like to thank the phenotyping facility (Anexplo-US006/CREFRE,
489 Toulouse, France) for all plasma analysis and technical assistance, GenoToul Genome and
490 Transcriptome core facility for technical assistance, Dr. Bernard Masri and the cellular
491 imaging facility of the Institut des maladies métaboliques et cardiovasculaires (Toulouse,
492 France) for helpful technical assistance.

493

494

495

496

497

498

499

500

501

502

503

504

505

506

507

508 **References:**

- 509 1. Mack M: Inflammation and fibrosis. *Matrix Biol* 2017, .
- 510 2. Weiskirchen R, Weiskirchen S, Tacke F: Organ and tissue fibrosis: Molecular signals,
511 cellular mechanisms and translational implications. *Mol Aspects Med*, Pergamon,
512 2018.
- 513 3. Vannella KM, Wynn TA: Mechanisms of Organ Injury and Repair by Macrophages.
514 *Annu Rev Physiol* 2017, 79:593–617.
- 515 4. Smigiel KS, Parks WC: Macrophages, Wound Healing, and Fibrosis: Recent Insights.
516 *Curr Rheumatol Rep* 2018, 20:17.
- 517 5. Thannickal VJ, Zhou Y, Gaggari A, Duncan SR: Fibrosis: ultimate and proximate
518 causes. *J Clin Invest* 2014, 124:4673–4677.
- 519 6. Lee J-M, Yoshida M, Kim M-S, Lee J-H, Baek A-R, Jang AS, Kim DJ, Minagawa S,
520 Chin SS, Park C-S, Araya J, Kuwano K, Park SW: Involvement of Alveolar Epithelial
521 Cell Necroptosis in IPF Pathogenesis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2018, :rcmb.2017-
522 0034OC.
- 523 7. Zhang W, Lavine KJ, Epelman S, Evans SA, Weinheimer CJ, Barger PM, Mann DL:
524 Necrotic Myocardial Cells Release Damage-Associated Molecular Patterns That
525 Provoke Fibroblast Activation In Vitro and Trigger Myocardial Inflammation and
526 Fibrosis In Vivo. *J Am Heart Assoc* 2015, 4:e001993–e001993.
- 527 8. Vénéreau E, Ceriotti C, Bianchi ME: DAMPs from Cell Death to New Life. *Front*
528 *Immunol* 2015, 6:422.
- 529 9. Andersson U, Yang H, Harris H: High-mobility group box 1 protein (HMGB1) operates
530 as an alarmin outside as well as inside cells. *Semin Immunol* 2018, .
- 531 10. Kang R, Chen R, Zhang Q, Hou W, Wu S, Cao L, Huang J, Yu Y, Fan X-G, Yan Z,
532 Sun X, Wang H, Wang Q, Tsung A, Billiar TR, Zeh HJ, Lotze MT, Tang D: HMGB1 in
533 health and disease. *Mol Aspects Med* 2014, 40:1–116.
- 534 11. Dear JW, Clarke JI, Francis B, Allen L, Wraight J, Shen J, Dargan PI, Wood D, Cooper
535 J, Thomas SHL, Jorgensen AL, Pirmohamed M, Park BK, Antoine DJ: Risk

- 536 stratification after paracetamol overdose using mechanistic biomarkers: results from
537 two prospective cohort studies. *Lancet Gastroenterol Hepatol* 2018, 3:104–113.
- 538 12. Venereau E, De Leo F, Mezzapelle R, Careccia G, Musco G, Bianchi ME: HMGB1 as
539 biomarker and drug target. *Pharmacol Res* 2016, 111:534–544.
- 540 13. Andersson U, Tracey KJ: HMGB1 Is a Therapeutic Target for Sterile Inflammation and
541 Infection. *Annu Rev Immunol* 2011, 29:139–162.
- 542 14. Andersson U, Wang H, Palmblad K, Aveberger AC, Bloom O, Erlandsson-Harris H,
543 Janson A, Kokkola R, Zhang M, Yang H, Tracey KJ: High mobility group 1 protein
544 (HMG-1) stimulates proinflammatory cytokine synthesis in human monocytes. *J Exp*
545 *Med*, Rockefeller University Press, 2000, 192:565–570.
- 546 15. Gil M, Kim YK, Hong SB, Lee KJ: Naringin Decreases TNF- α and HMGB1 Release
547 from LPS-Stimulated Macrophages and Improves Survival in a CLP-Induced Sepsis
548 Mice. Mukhopadhyay P, editor. *PLoS One*, Public Library of Science, 2016,
549 11:e0164186.
- 550 16. El Gazzar M: HMGB1 modulates inflammatory responses in LPS-activated
551 macrophages. *Inflamm Res* 2007, 56:162–167.
- 552 17. Gardella S, Andrei C, Ferrera D, Lotti L V, Torrisi MR, Bianchi ME, Rubartelli A: The
553 nuclear protein HMGB1 is secreted by monocytes via a non-classical, vesicle-
554 mediated secretory pathway. *EMBO Rep*, European Molecular Biology Organization,
555 2002, 3:995–1001.
- 556 18. Tirone M, Tran NL, Ceriotti C, Gorzanelli A, Canepari M, Bottinelli R, Raucci A, Di
557 Maggio S, Santiago C, Mellado M, Saclier M, François S, Careccia G, He M, De
558 Marchis F, Conti V, Ben Larbi S, Cuvellier S, Casalgrandi M, Preti A, Chazaud B, Al-
559 Abed Y, Messina G, Sitia G, Brunelli S, Bianchi ME, Vénéreau E: High mobility group
560 box 1 orchestrates tissue regeneration via CXCR4. *J Exp Med* 2018, 215:303–318.
- 561 19. Hernandez C, Huebener P, Pradere J-P, Antoine DJ, Friedman RA, Schwabe RF:
562 HMGB1 links chronic liver injury to progenitor responses and hepatocarcinogenesis. *J*
563 *Clin Invest* 2018, .

- 564 20. Khambu B, Huda N, Chen X, Antoine DJ, Li Y, Dai G, Köhler UA, Zong W-X, Waguri
565 S, Werner S, Oury TD, Dong Z, Yin X-M: HMGB1 promotes ductular reaction and
566 tumorigenesis in autophagy-deficient livers. *J Clin Invest* 2018, .
- 567 21. Lee G, Espirito Santo AI, Zwingenberger S, Cai L, Vogl T, Feldmann M, Horwood NJ,
568 Chan JK, Nanchahal J: Fully reduced HMGB1 accelerates the regeneration of multiple
569 tissues by transitioning stem cells to G_{Alert}. *Proc Natl Acad Sci* 2018, 115:E4463–
570 E4472.
- 571 22. Troeger JS, Mederacke I, Gwak G-Y, Dapito DH, Mu X, Hsu CC, Pradere J-P,
572 Friedman RA, Schwabe RF: Deactivation of hepatic stellate cells during liver fibrosis
573 resolution in mice. *Gastroenterology* 2012, 143:1073–83.e22.
- 574 23. Pradere J-P, Kluwe J, De Minicis S, Jiao J-J, Gwak G-Y, Dapito DH, Jang M-K,
575 Guenther ND, Mederacke I, Friedman R, Dragomir A-C, Aloman C, Schwabe RF:
576 Hepatic macrophages but not dendritic cells contribute to liver fibrosis by promoting
577 the survival of activated hepatic stellate cells in mice. *Hepatology* 2013, 58:1461–
578 1473.
- 579 24. Chevalier RL, Forbes MS, Thornhill BA: Ureteral obstruction as a model of renal
580 interstitial fibrosis and obstructive nephropathy. *Kidney Int* 2009, 75:1145–1152.
- 581 25. Bisselier M, Berthouze-Duquesnes M, Breckler M, Tortosa F, Fazal L, de Régibus A,
582 Laurent A-C, Varin A, Lucas A, Branchereau M, Marck P, Schickel J-N, Deloménie C,
583 Cazoria O, Soulas-Sprauel P, Crozatier B, Morel E, Heymes C, Lezoualc'h F: Carabin
584 Protects Against Cardiac Hypertrophy by Blocking Calcineurin, Ras, and Ca²⁺
585 /Calmodulin-Dependent Protein Kinase II SignalingCLINICAL PERSPECTIVE.
586 *Circulation* 2015, 131:390–400.
- 587 26. Clausen BE, Burkhardt C, Reith W, Renkawitz R, Förster I: Conditional gene targeting
588 in macrophages and granulocytes using LysMcre mice. *Transgenic Res* 1999, 8:265–
589 277.
- 590 27. Huebener P, Gwak G-Y, Pradere J-P, Quinzii CM, Friedman R, Lin C-S, Trent CM,
591 Mederacke I, Zhao E, Dapito DH, Lin Y, Goldberg IJ, Czaja MJ, Schwabe RF: High-

- 592 mobility group box 1 is dispensable for autophagy, mitochondrial quality control, and
593 organ function in vivo. *Cell Metab* 2014, 19:539–547.
- 594 28. Xia Y, Lee K, Li N, Corbett D, Mendoza L, Frangogiannis NG: Characterization of the
595 inflammatory and fibrotic response in a mouse model of cardiac pressure overload.
596 *Histochem Cell Biol* 2009, 131:471–481.
- 597 29. Giles DA, Moreno-Fernandez ME, Stankiewicz TE, Graspentner S, Cappelletti M, Wu
598 D, Mukherjee R, Chan CC, Lawson MJ, Klarquist J, Sünderhauf A, Softic S, Kahn CR,
599 Stemmer K, Iwakura Y, Aronow BJ, Karns R, Steinbrecher KA, Karp CL, Sheridan R,
600 Shanmukhappa SK, Reynaud D, Haslam DB, Sina C, Rupp J, Hogan SP, Divanovic S:
601 Thermoneutral housing exacerbates nonalcoholic fatty liver disease in mice and
602 allows for sex-independent disease modeling. *Nat Med*, Nature Publishing Group,
603 2017, 23:829–838.
- 604 30. Tian XY, Ganeshan K, Hong C, Nguyen KD, Qiu Y, Kim J, Tangirala RK, Tontonoz P,
605 Chawla A: Thermoneutral Housing Accelerates Metabolic Inflammation to Potentiate
606 Atherosclerosis but Not Insulin Resistance. *Cell Metab*, Elsevier, 2016, 23:165–178.
- 607 31. Ganeshan K, Chawla A: Warming the mouse to model human diseases. *Nat Rev*
608 *Endocrinol* 2017, 13:458–465.
- 609 32. Wick G, Backovic A, Rabensteiner E, Plank N, Schwentner C, Sgonc R: The
610 immunology of fibrosis: innate and adaptive responses. *Trends Immunol*, Europe PMC
611 *Funders*, 2010, 31:110–119.
- 612 33. Koyama Y, Brenner DA: Liver inflammation and fibrosis. *J Clin Invest*, American
613 *Society for Clinical Investigation*, 2017, 127:55–64.
- 614 34. Ge X, Arriazu E, Magdaleno F, Antoine DJ, dela Cruz R, Theise N, Nieto N: High
615 mobility group box-1 drives fibrosis progression signaling via the receptor for
616 advanced glycation end-products in mice. *Hepatology* 2018, .
- 617 35. Tang D, Kang R, Livesey KM, Kroemer G, Billiar TR, Van Houten B, Zeh HJ, Lotze
618 MT: High-Mobility Group Box 1 Is Essential for Mitochondrial Quality Control. *Cell*
619 *Metab* 2011, 13:701–711.

- 620 36. Chen R, Zhu S, Fan X-G, Wang H, Lotze MT, Zeh HJ, Billiar TR, Kang R, Tang D:
621 High mobility group protein B1 controls liver cancer initiation through yes-associated
622 protein -dependent aerobic glycolysis. *Hepatology* 2018, 67:1823–1841.
- 623 37. Sun X, Tang D: Hepatocyte-specific *Hmgb1* Deletion. *Autophagy* 2015, 11:1189–
624 1191.
- 625 38. Huebener P, Gwak GY, Schwabe RF: Comment on: HMGB1-dependent and -
626 independent autophagy. *Autophagy* 2015, 11:1187–1188.
- 627 39. Sun X, Tang D: HMGB1-dependent and -independent autophagy. *Autophagy* 2014,
628 10:1873–1876.
- 629 40. Davé SH, Tilstra JS, Matsuoka K, Li F, DeMarco RA, Beer-Stolz D, Sepulveda AR,
630 Fink MP, Lotze MT, Plevy SE: Ethyl pyruvate decreases HMGB1 release and
631 ameliorates murine colitis. *J Leukoc Biol* 2009, 86:633–643.
- 632 41. Entezari M, Javdan M, Antoine DJ, Morrow DMP, Sitapara RA, Patel V, Wang M,
633 Sharma L, Gorasiya S, Zur M, Wu W, Li J, Yang H, Ashby CR, Thomas D, Wang H,
634 Mantell LL: Inhibition of extracellular HMGB1 attenuates hyperoxia-induced
635 inflammatory acute lung injury. *Redox Biol* 2014, 2:314–322.
- 636 42. Shimizu T, Yamakuchi M, Biswas KK, Aryal B, Yamada S, Hashiguchi T, Maruyama I:
637 HMGB1 is secreted by 3T3-L1 adipocytes through JNK signaling and the secretion is
638 partially inhibited by adiponectin. *Obesity (Silver Spring)* 2016, 24:1913–1921.
- 639 43. Lee H, Park M, Shin N, Kim G, Kim YG, Shin J-S, Kim H: High mobility group box-1 is
640 phosphorylated by protein kinase C zeta and secreted in colon cancer cells. *Biochem*
641 *Biophys Res Commun* 2012, 424:321–326.
- 642 44. Wang L, He L, Bao G, He X, Fan S, Wang H: Ionizing Radiation Induces HMGB1
643 Cytoplasmic Translocation and Extracellular Release. *Guo ji fang she yi xue he yi xue*
644 *za zhi = Int J Radiat Med Nucl Med* 2016, 40:91–99.
- 645 45. Huebener P, Pradere J-P, Hernandez C, Gwak G-Y, Caviglia JM, Mu X, Loike JD,
646 Jenkins RE, Antoine DJ, Schwabe RF: The HMGB1/RAGE axis triggers neutrophil-
647 mediated injury amplification following necrosis. *J Clin Invest* 2015, 125:539–550.

- 648 46. Yanai H, Matsuda A, An J, Koshiba R, Nishio J, Negishi H, Ikushima H, Onoe T,
649 Ohdan H, Yoshida N, Taniguchi T: Conditional ablation of HMGB1 in mice reveals its
650 protective function against endotoxemia and bacterial infection. *Proc Natl Acad Sci*
651 2013, 110:20699–20704.
- 652 47. Seki E, De Minicis S, Österreicher CH, Kluwe J, Osawa Y, Brenner DA, Schwabe RF:
653 TLR4 enhances TGF- β signaling and hepatic fibrosis. *Nat Med* 2007, 13:1324–1332.
- 654 48. Li XX, Jiang DY, Huang XX, Guo SL, Yuan W, Dai HP: Toll-like receptor 4 promotes
655 fibrosis in bleomycin-induced lung injury in mice. *Genet Mol Res* 2015, 14:17391–
656 17398.
- 657 49. Dong R, Wang Z, Zhao C, Gu H, Hu Z, Xie J, Wu Y: Toll-like receptor 4 knockout
658 protects against isoproterenol-induced cardiac fibrosis: the role of autophagy. *J*
659 *Cardiovasc Pharmacol Ther* 2015, 20:84–92.
- 660 50. Wang L, Li Y-L, Zhang C-C, Cui W, Wang X, Xia Y, Du J, Li H-H: Inhibition of Toll-like
661 receptor 2 reduces cardiac fibrosis by attenuating macrophage-mediated
662 inflammation. *Cardiovasc Res* 2014, 101:383–392.
- 663 51. Watanabe A, Hashmi A, Gomes DA, Town T, Badou A, Flavell RA, Mehal WZ:
664 Apoptotic hepatocyte DNA inhibits hepatic stellate cell chemotaxis via toll-like receptor
665 9. *Hepatology* 2007, 46:1509–1518.
- 666 52. Gäbele E, Mühlbauer M, Dorn C, Weiss TS, Froh M, Schnabl B, Wiest R, Schölmerich
667 J, Obermeier F, Hellerbrand C: Role of TLR9 in hepatic stellate cells and experimental
668 liver fibrosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2008, 376:271–276.
- 669 53. Englert JM, Hanford LE, Kaminski N, Tobolewski JM, Tan RJ, Fattman CL,
670 Ramsgaard L, Richards TJ, Loutaev I, Nawroth PP, Kasper M, Bierhaus A, Oury TD: A
671 role for the receptor for advanced glycation end products in idiopathic pulmonary
672 fibrosis. *Am J Pathol* 2008, 172:583–591.
- 673 54. Ramsgaard L, Englert JM, Tobolewski J, Tomai L, Fattman CL, Leme AS, Kaynar AM,
674 Shapiro SD, Enghild JJ, Oury TD: The Role of the Receptor for Advanced Glycation
675 End-Products in a Murine Model of Silicosis. Morty RE, editor. *PLoS One* 2010,

676 5:e9604.

677 55. Gasparitsch M, Arndt A-K, Pawlitschek F, Oberle S, Keller U, Kasper M, Bierhaus A,
678 Schaefer F, Weber LT, Lange-Sperandio B: RAGE-mediated interstitial fibrosis in
679 neonatal obstructive nephropathy is independent of NF-κB activation. *Kidney Int* 2013,
680 84:911–919.

681 56. Chen L, Li J, Zhang J, Dai C, Liu X, Wang J, Gao Z, Guo H, Wang R, Lu S, Wang F,
682 Zhang H, Chen H, Fan X, Wang S, Qin Z: S100A4 promotes liver fibrosis via activation
683 of hepatic stellate cells. *J Hepatol* 2015, 62:156–164.

684

685

686

687

688

689

690

691

692

693

694

695

696

697

698

699

700

701

702

703

704

Time post surgery Genotype	4 weeks			
	HMGB1 ^{Flox} Sham	HMGB1 ^{ΔMac} Sham	HMGB1 ^{Flox} +TAC	HMGB1 ^{ΔMac} +TAC
Echocardiographic parameters				
LVEDD (mm)	3.443±0.12	3.435±0.11	4.018±0.15 **	3.846±0.12 **
LVEDS (mm)	1.955±0.09	1.98±0.12	2.604±0.22 *	2.39±0.16 *
FS (%)	43.25±1,93	42.25±1,79	36.25±3,29	38.36±2,37
Anatomical parameters				
BW (g)	31.94±0.54	30.49±1.25	27.29±0.90 **	28.73±0.69**
Heart Weight (mg)	144.3±7.14	152±3.51	169.5±11.21 *	174.3±6.38 *
HW/TL (mg/mm)	78.27±3.81	82.51±1.70	97.8±6.22**	98.6±3.64**

705

706 **Table1:** Echocardiographic and anatomical analysis as a function of TAC. Statistical analysis
707 was performed with a two-way ANOVA analysis. Data are expressed as means ± SEM. n=4
708 in HMGB1^{Flox}/sham group; n=4 in HMGB1^{ΔMac}/sham group; n=8 in HMGB1^{Flox}/TAC group;
709 n=13 in HMGB1^{ΔMac}/TAC group. *p<0,05, **p<0,01 versus sham/TAC. HMGB1: High mobility
710 group B1, LVEDS: left ventricular end-systolic dimension; LVEDD: left ventricular end-
711 diastolic dimension; FS: fractional shortening; BW: body weight; HW/TL: heart weight to tibia
712 length ratio.

713

714

715

716

717

718

719

720

721

722

723

724

725 **Figure Legends:**

726 **Figure 1:** HMGB1 regulation during fibrosis and validation and characterization of
727 macrophage-specific deletion of HMGB1. **A:** Representative immunoblotting against HMGB1
728 in oil (n=9) or CCL₄ treated (n=15)-liver using GAPDH protein as a loading control. **B:**
729 Representative immunoblotting against HMGB1 in liver extracts from sham (n=9) or BDL
730 (n=4) animals using GAPDH protein as a loading control. **C:** Peritoneal macrophages
731 isolated from HMGB1^{Flox} (n=3) and HMGB1^{ΔMac} mice (n=3), were analyzed by immunoblotting
732 against HMGB1 and GAPDH. **D:** Cells from liver stromal vascular fraction, isolated from
733 HMGB1^{ΔMac} and HMGB1^{Flox} mice, were analyzed by immunoblotting against HMGB1 and
734 GAPDH. **E:** Cells from lung stromal vascular fraction, isolated from HMGB1^{Flox} (n=3) and
735 HMGB1^{ΔMac} mice (n=3), were analyzed by immunoblotting against HMGB1 and GAPDH. **F:**
736 Bone marrow-derived macrophages (BMDM) isolated from HMGB1^{Flox} (n=3) and HMGB1^{ΔMac}
737 mice (n=3), were analyzed by immunoblotting against HMGB1 and GAPDH (higher panel).
738 BMDM isolated from HMGB1^{Flox} and HMGB1^{ΔMac} mice were analyzed by
739 immunofluorescence confocal microscopy to detect HMGB1 (red) while nuclei were stained
740 with DAPI (blue) (lower panel). **G:** Liver extracts of HMGB1^{Flox} (n=9) and HMGB1^{ΔMac} (n=6)
741 mice were analyzed by western blotting directed against α-SMA. **H:** Representative images
742 of liver fibrosis determined by picosirius Red staining from HMGB1^{Flox} (n=9) and HMGB1^{ΔMac}
743 (n=6) mice. **I:** Representative images of myofibroblast activation determined by α-SMA
744 immunostaining from HMGB1^{Flox} (n=9) and HMGB1^{ΔMac} (n=6) mice liver sections. Scale bar:
745 5μm (F), 500 μm (H-I). Original 63x (F). HMGB1: High mobility group box 1, CCL₄: Carbon
746 tetrachloride, BDL: bile duct ligation, TAA: Thioacetamide, α-SMA: α-smooth muscle actin.
747 GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

748

749 **Figure 2:** Macrophage-specific deletion of HMGB1 does not modify liver fibrogenesis after
750 CCL₄ treatment. **A:** Representative pictures of picosirius red staining of HMGB1^{Flox} mice and
751 HMGB1^{ΔMac} of liver section and quantification of positive pixels per liver section. **B:**

752 Representative pictures of immunohistochemical staining with an antibody against α -SMA
753 and quantification of positive pixels per liver section. **C:** Liver extracts from HMGB1^{Flox} mice
754 and HMGB1 ^{Δ Mac} were analyzed by western blotting directed against α -SMA. **D:** Liver mRNA
755 expression levels of classical fibrosis markers were detected using real-time RT-PCR, the
756 dotted line indicates the baseline. **E:** Hepatic injury in HMGB1^{Flox} mice and HMGB1 ^{Δ Mac} was
757 determined by ALT (left panel) and AST (right panel) levels. Statistical analysis was
758 performed using Mann and Whitney test. Data are expressed as means \pm SEM. n=9 in
759 HMGB1^{Flox}/oil group; n=6 in HMGB1 ^{Δ Mac}/oil group; n=15 in HMGB1^{Flox}/CCL₄ group; n=12 in
760 HMGB1 ^{Δ Mac}/CCL₄ group. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, **** p<0,0001 versus oil/CCL₄. Scale
761 bar: 500 μ m (**A-B**). HMGB1: high mobility group box 1, CCL₄: Carbon Tetrachloride, α -SMA:
762 α -smooth muscle actin. GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. Acta2: alpha
763 actin2, Col1a1: type1 alpha1 collagen, Col3a1: type3 alpha1 collagen, Emr1: EGF-like
764 module containing mucin-like hormone receptor-like 1. ALT: Alanine transaminase, AST:
765 Aspartate transaminase.

766

767 **Figure 3:** Macrophage-specific deletion of HMGB1 does not modify liver fibrogenesis after
768 TAA treatment. **A:** Representative pictures of picrosirius red staining of HMGB1^{Flox} mice and
769 HMGB1 ^{Δ Mac} of liver section and quantification of positive pixels per liver section. **B:**
770 Representative pictures of immunohistochemical staining with an antibody against α -SMA
771 and quantification of positive pixels per liver section. **C:** Liver extracts from HMGB1^{Flox} mice
772 and HMGB1 ^{Δ Mac} were analyzed by western blotting directed against α -SMA. **D:** Liver mRNA
773 expression levels of classical fibrosis markers were detected using real-time RT-PCR, the
774 dotted line indicates the baseline. **E:** Hepatic injury in HMGB1^{Flox} mice and HMGB1 ^{Δ Mac} was
775 determined by ALT (left panel) and AST (right panel) levels. Statistical analysis was
776 performed with Mann and Whitney test. Data are expressed as means \pm SEM. n=6 in
777 HMGB1^{Flox}/saline group; n=6 in HMGB1 ^{Δ Mac}/saline group; n=7 in HMGB1^{Flox}/TAA group; n=11
778 in HMGB1 ^{Δ Mac}/TAA group. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 versus saline/TAA. Scale bar:
779 500 μ m (**A-B**). HMGB1: High mobility group box 1, TAA: Thioacetamide, α -SMA: α -smooth

780 muscle actin. GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. Acta2: alpha actin2,
781 Col1a1: type1 alpha1 collagen, Col3a1: type3 alpha1 collagen, Emr1: EGF-like module
782 containing mucin-like hormone receptor-like 1. ALT: Alanine transaminase, AST: Aspartate
783 transaminase.

784

785 **Figure 4:** Macrophage-specific deletion of HMGB1 does not alter liver fibrogenesis after
786 BDL. **A:** Representative pictures of picosirius red staining of HMGB1^{Flox} mice and
787 HMGB1^{ΔMac} of liver section and quantification of positive pixels per liver section. **B:**
788 Representative pictures of immunohistochemical staining with an antibody against α-SMA
789 and quantification of positive pixels per liver section. **C:** Liver extracts from HMGB1^{Flox} mice
790 and HMGB1^{ΔMac} were analyzed by western blotting directed against α-SMA. **D:** Liver mRNA
791 expression levels of classical fibrosis markers were detected using real-time RT-PCR, the
792 dotted line indicates the baseline. **E:** Hepatic injury in HMGB1^{Flox} mice and HMGB1^{ΔMac} was
793 determined by ALT (left panel) and AST (right panel) levels. Statistical analysis was
794 performed with Mann and Whitney test. Data are expressed as means ± SEM. n=6 in
795 HMGB1^{Flox}/sham group; n=6 in HMGB1^{ΔMac}/sham group; n=4 in HMGB1^{Flox}/BDL group; n=7
796 in HMGB1^{ΔMac}/BDL group. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, **** p<0,0001 versus sham/BDL.
797 Scale bar: 500 μm (**A-B**). HMGB1: High mobility group box 1, BDL: Bile duct ligation, α-
798 SMA: α-smooth muscle actin. GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. Acta2:
799 alpha actin2, Col1a1: type1 alpha1 collagen, Col3a1: type3 alpha1 collagen, Emr1: EGF-like
800 module containing mucin-like hormone receptor-like 1. ALT: Alanine transaminase, AST:
801 Aspartate transaminase.

802

803 **Figure 5:** Macrophage-specific deletion of HMGB1 does not play a role in UUO induced
804 kidney fibrosis. **A:** Representative pictures of picosirius red staining of HMGB1^{Flox} mice and
805 HMGB1^{ΔMac} of kidney section and quantification of positive pixels per kidney section. **B:**
806 Representative pictures of immune-histochemical staining with an antibody against α-SMA
807 and quantification of positive pixels per kidney section. **C:** Kidney extracts from HMGB1^{Flox}

808 and HMGB1^{ΔMac} mice were analyzed by western blotting directed against α-SMA. **D:** Kidney
809 mRNA expression levels of classical fibrosis markers were detected using real-time RT-PCR,
810 the dotted line indicates the baseline. Statistical analysis was performed with Mann and
811 Whitney test. Data are expressed as means ± SEM. n=3 in HMGB1^{Flox}/sham group; n=3 in
812 HMGB1^{ΔMac}/sham group; n=12 in HMGB1^{Flox}/UUO group; n=10 in HMGB1^{ΔMac}/UUO group.
813 *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 versus sham/UUO. Scale bar: 500 μm (**A-B**). HMGB1: High
814 mobility group box 1. UUO: Unilateral Ureteral Obstruction, α-SMA: α-smooth muscle actin.
815 GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. Acta2: alpha actin2, Col1a1: type1
816 alpha1 Collagen, col3a1: type3 alpha1 collagen, Emr1: EGF-like module containing mucin-
817 like hormone receptor-like 1.

818

819 **Figure 6:** Macrophage-specific deletion of HMGB1 does not modify cardiac fibrogenesis
820 after TAC. **A:** Representative pictures of picrosirius red staining of HMGB1^{Flox} mice and
821 HMGB1^{ΔMac} of heart section and quantification of positive pixels per heart section. **B:**
822 Representative pictures of immunohistochemical staining with an antibody against α-SMA
823 and quantification of positive pixels per heart section. **C:** Heart extracts from HMGB1^{Flox} mice
824 and HMGB1^{ΔMac} were analyzed by western blotting directed against α-SMA. **D:** Heart mRNA
825 expression levels of classical fibrosis markers were detected using real-time RT-PCR, the
826 dotted line indicates the baseline. Statistical analysis was performed with Mann and Whitney
827 test. Data are expressed as means ± SEM. n=3 in HMGB1^{Flox}/sham group; n=3 in
828 HMGB1^{ΔMac}/sham group; n=8 in HMGB1^{Flox}/TAC group; n=11 in HMGB1^{ΔMac}/TAC group.
829 *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 versus sham/TAC. Scale bar: 500 μm (**A-B**). HMGB1: high
830 mobility group box 1. TAC: Transverse Aortic Constriction. α-SMA: α-smooth muscle actin.
831 GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. Acta2: alpha actin2, Col1a1: type1
832 alpha1 collagen. Col3a1: type3 alpha1 collagen. Emr1: EGF-like module containing mucin-
833 like hormone receptor-like 1.

834

835 **Figure 7:** Thermoneutral housing has no incidence of fibrosis progression in HMGB1^{ΔMac}
836 mice compared to HMGB1^{Flox} mice. **A-B:** Representative pictures of picrosirius red staining of
837 sham and operated HMGB1^{Flox} mice and HMGB1^{ΔMac} of liver (**A**) and kidney (**B**) and
838 quantification of positive pixels per tissue section. **C-D:** Representative pictures of
839 immunohistochemical staining of shams and operated HMGB1^{Flox} and HMGB1^{ΔMac} mice with
840 an antibody against α-SMA in liver (**C**) and kidney (**D**) and quantification of positive pixels per
841 tissue section. **E-F:** Liver (**E**) and kidney (**F**) extracts from sham and operated HMGB1^{Flox} and
842 HMGB1^{ΔMac} mice were analyzed by western blotting directed against α-SMA. **G-H:** Liver (**G**)
843 and kidney (**H**) mRNA expression levels of classical fibrosis markers expressed in fold of
844 sham-operated animals (dotted line) were detected using real-time RT-PCR, the dotted line
845 indicates the baseline. Statistical analysis was performed with Mann and Whitney test. Data
846 are expressed as means ± SEM. n=4 (liver) n=3 (kidney) in HMGB1^{Flox}/sham group; n=3
847 (liver & kidney) in HMGB1^{ΔMac}/sham group; n=5 in HMGB1^{Flox}/BDL group; n=7 in
848 HMGB1^{ΔMac}/BDL group; n=12 in HMGB1^{Flox}/UUO group; n=12 in HMGB1^{ΔMac}/UUO group.
849 *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, **** p<0,0001 versus sham/BDL or sham/UUO. Scale bar:
850 100 μm (**A-D**). HMGB1: high mobility group box 1, BDL: Bile duct ligation, UUO: Unilateral
851 Ureteral Obstruction, α-SMA: α-smooth muscle actin. GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate
852 dehydrogenase. Acta2: alpha actin2, Col1a1: type1 alpha1 collagen, Col3a1: type3 alpha1
853 collagen, Emr1: EGF-like module containing mucin-like hormone receptor-like 1. ALT:
854 Alanine transaminase, AST: Aspartate transaminase.

Figure 1:

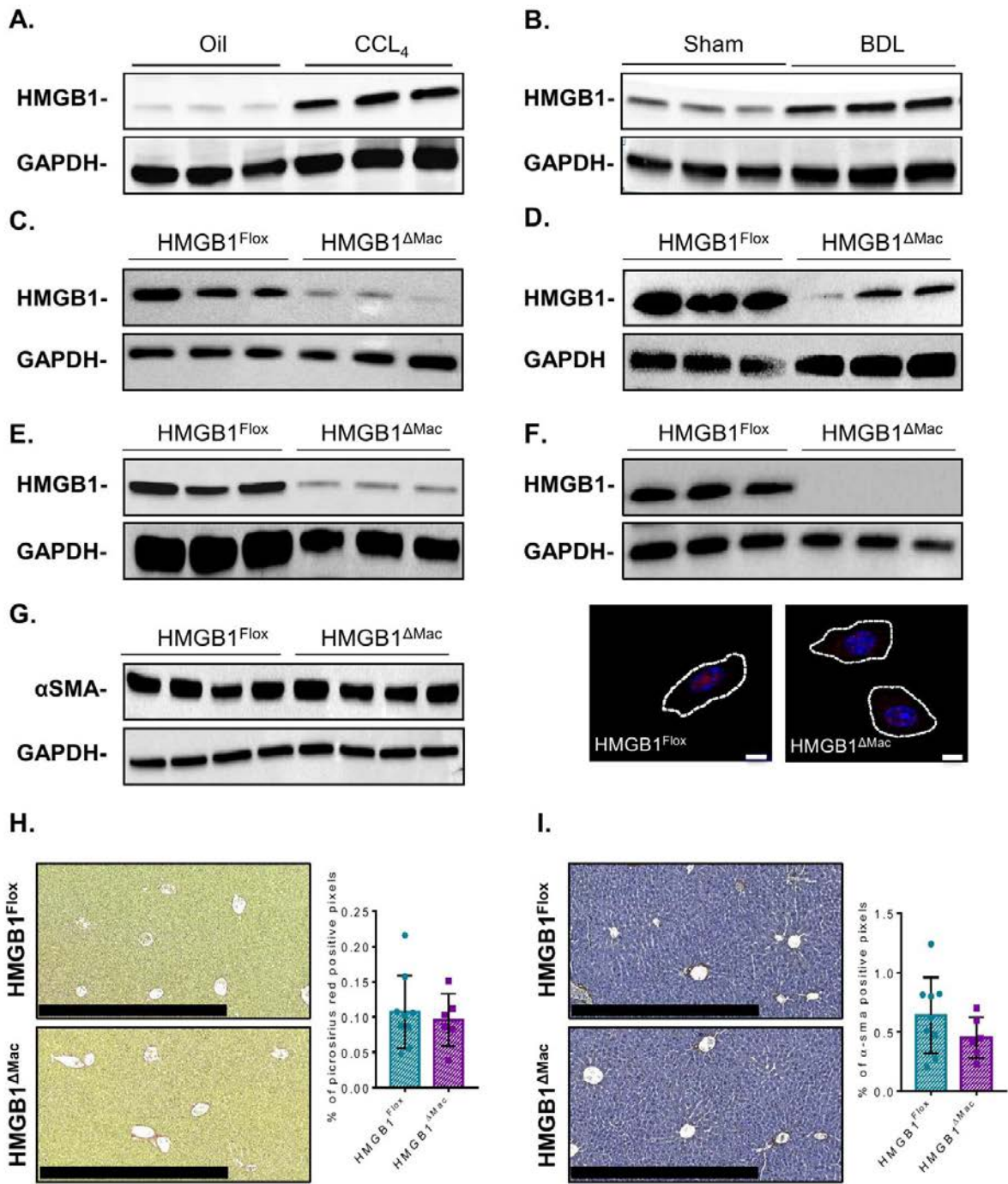


Figure 2:

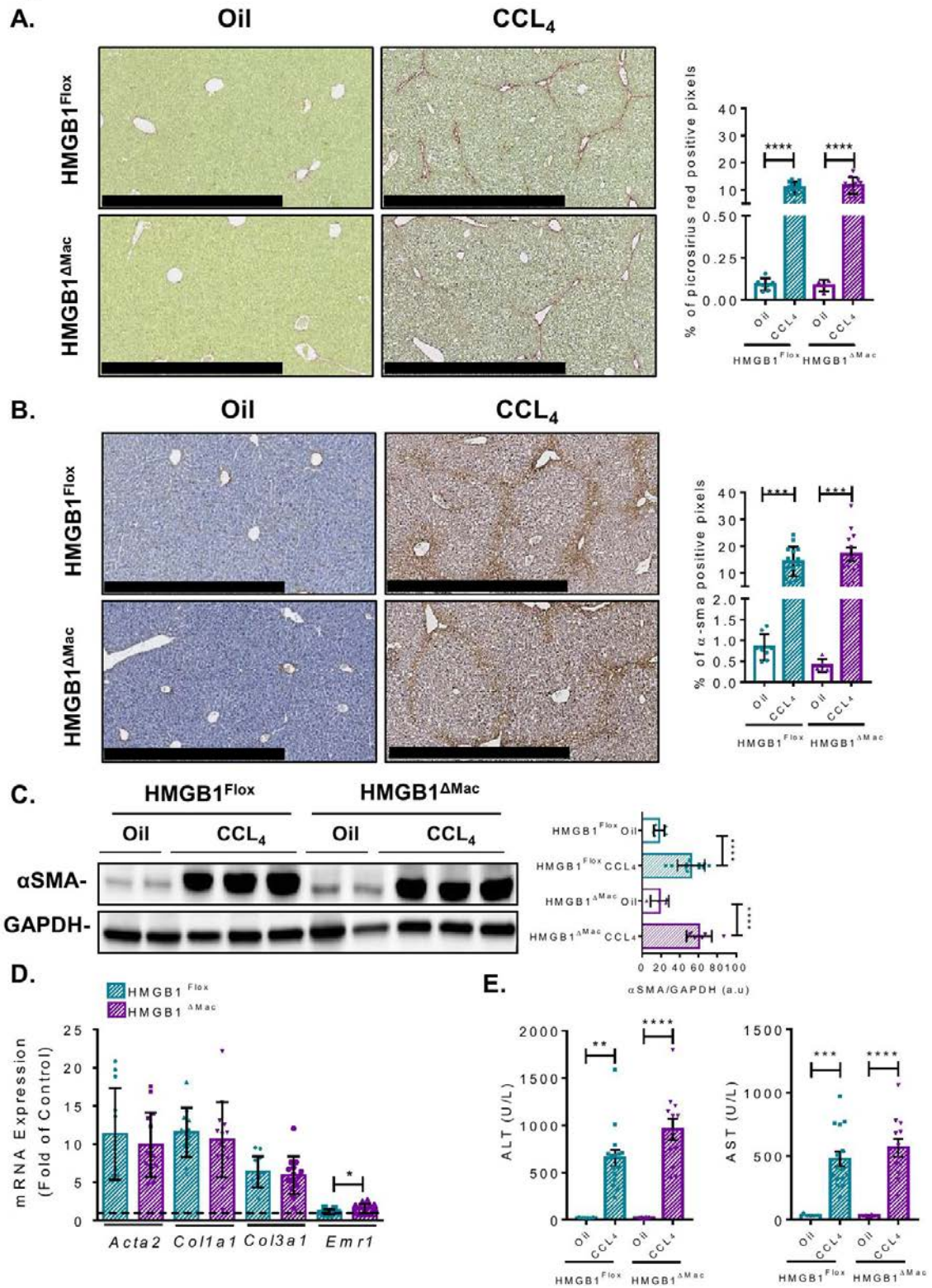


Figure 3:

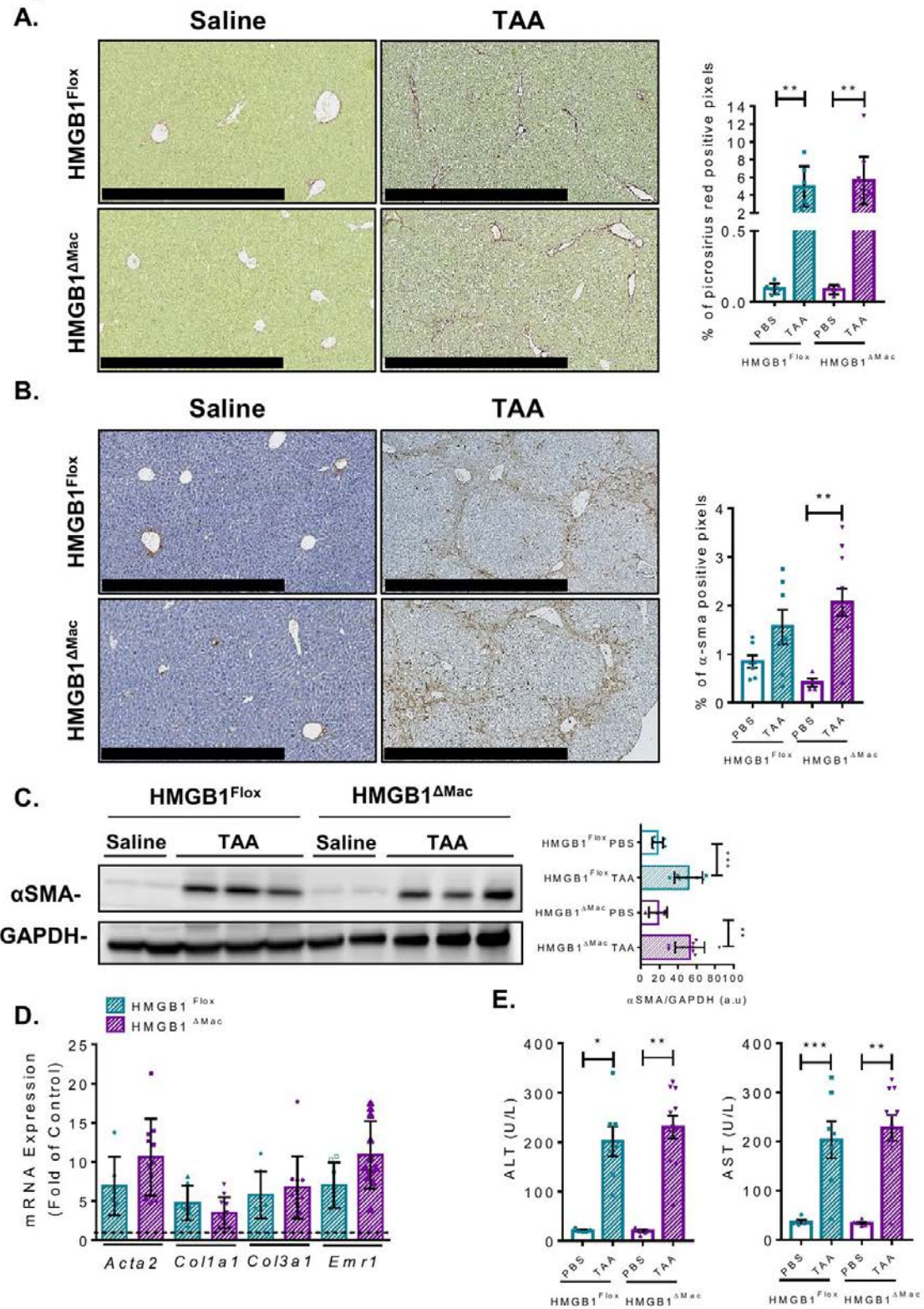


Figure 4:

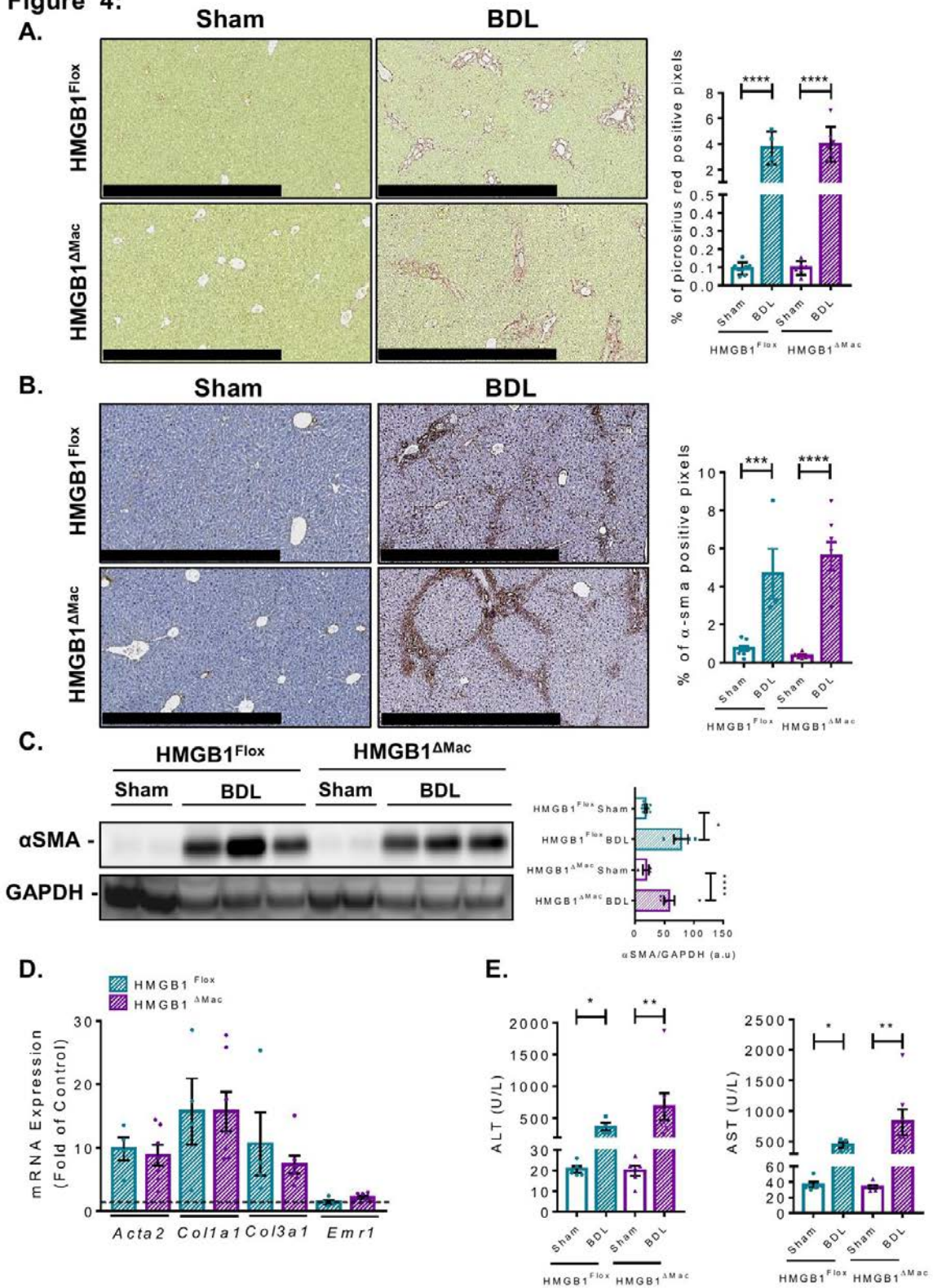


Figure 5:

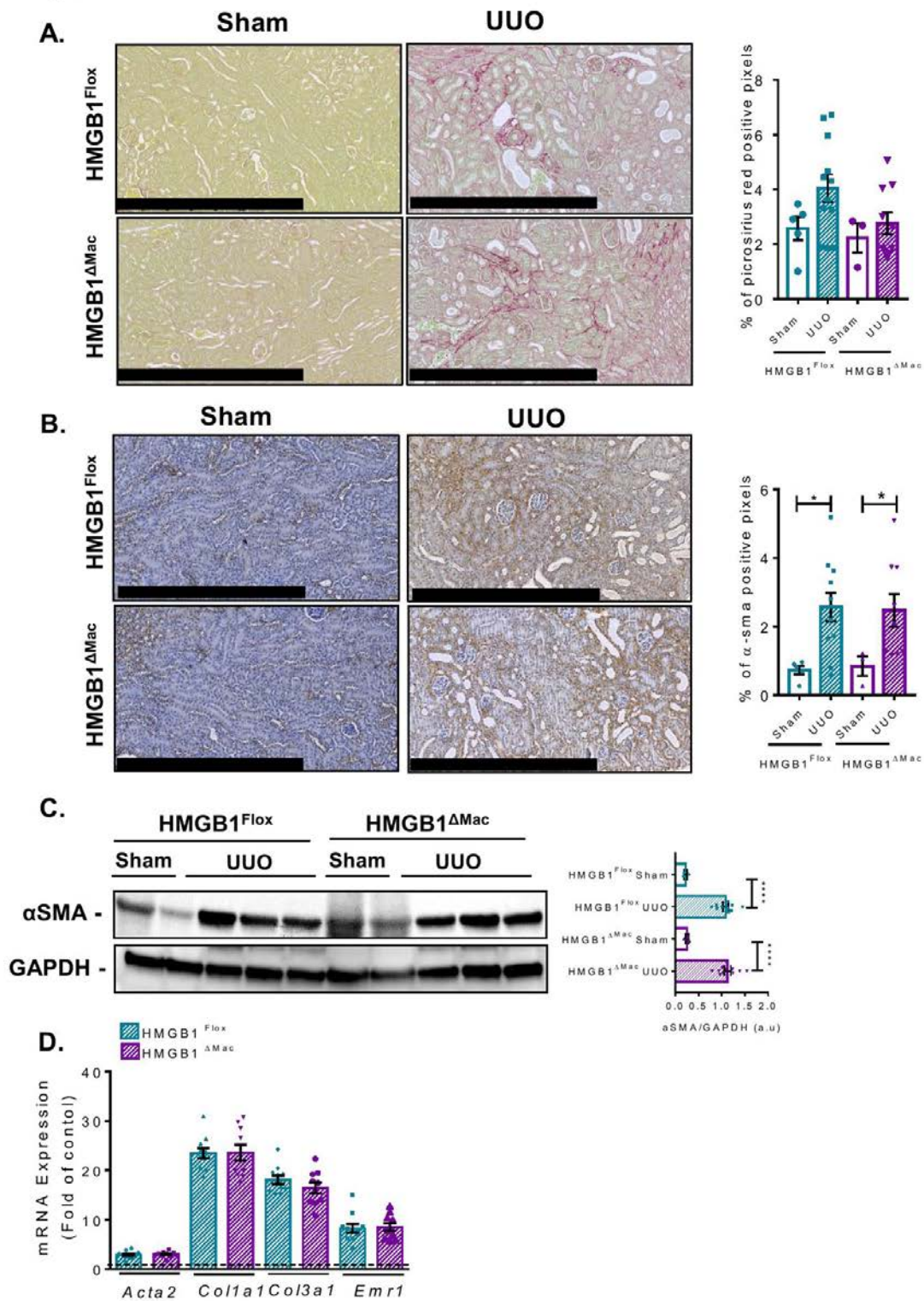


Figure 6:

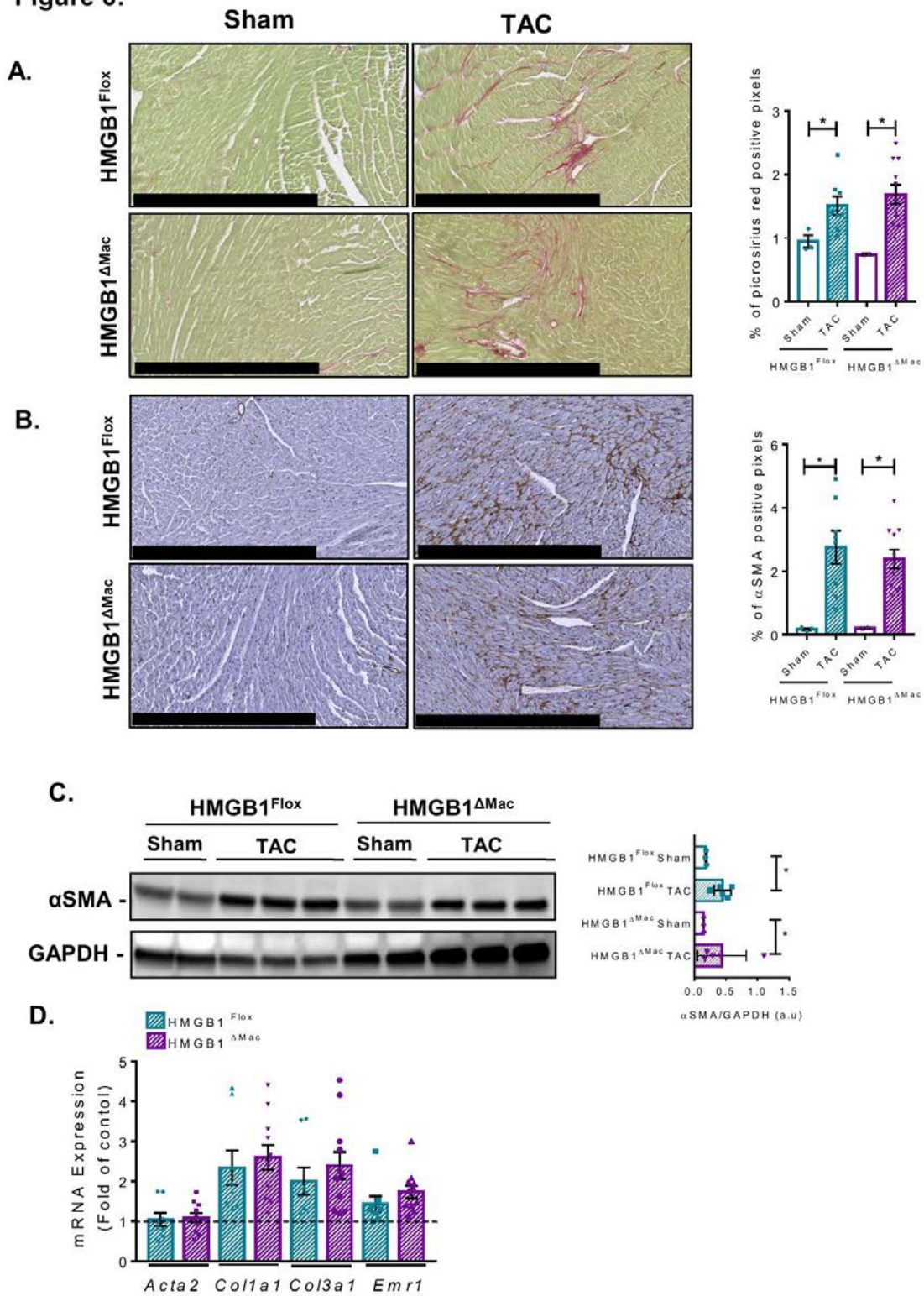
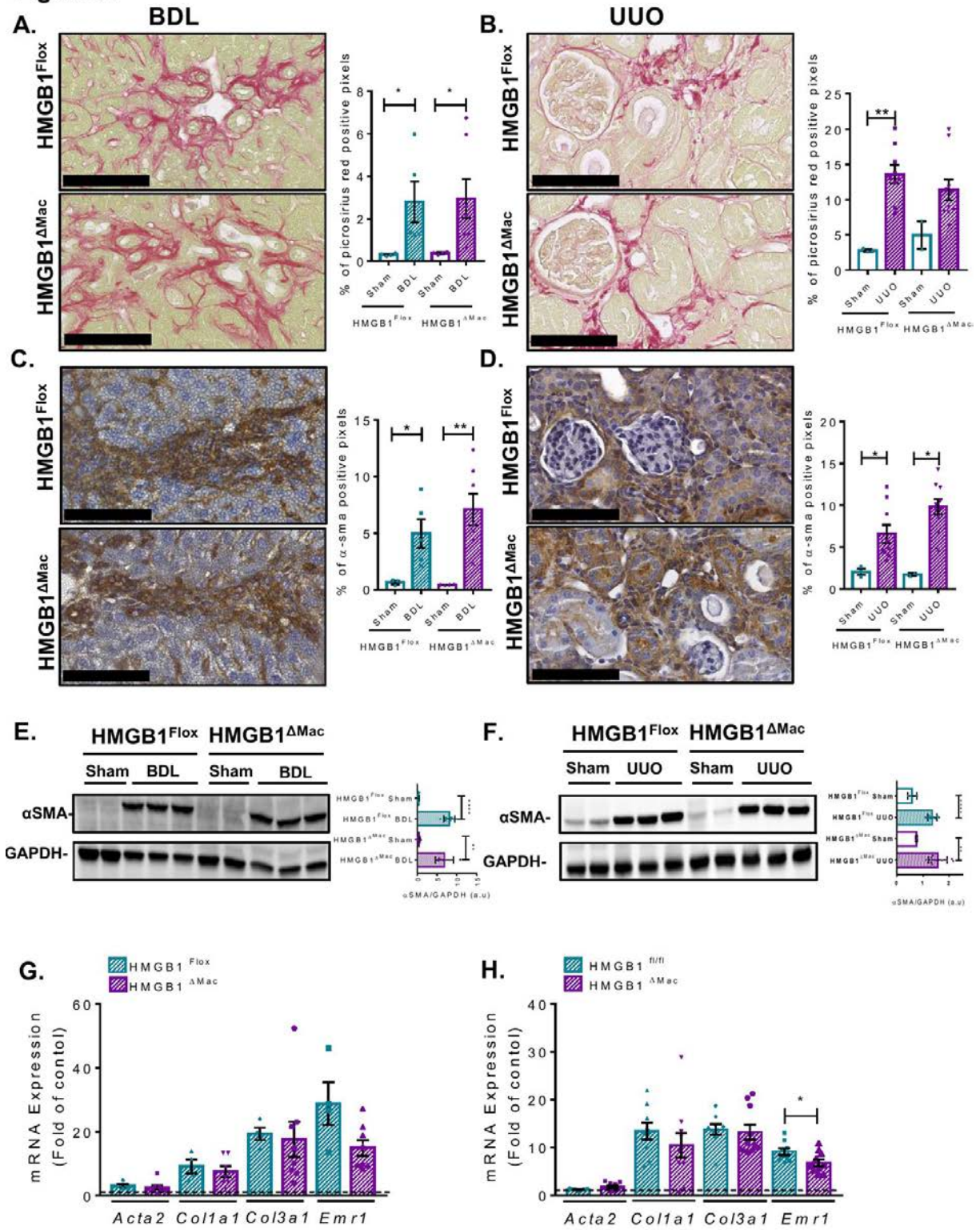


Figure 7:



Supplementary Figure 1: Deletion PCR in all mice cohorts of our study. **A:** PCR strategy used to determine the gene deletion after recombination generated by LysM-Cre recombinase using Forward primer F1 and Reverse R2 flanking remnant loxP site inserted between exon 1 and 5. **B:** Representative pictures of deletion PCR from DNA extracted on whole liver on HMGB1^{Flox} and HMGB1^{ΔMac} under control conditions. **C:** Representative pictures of deletion PCR from DNA extracted on whole liver on HMGB1^{Flox} and HMGB1^{ΔMac} subjected to 8 injections of CCL₄. **D:** Representative pictures of deletion PCR from DNA extracted on whole liver on HMGB1^{Flox} and HMGB1^{ΔMac} subjected to 18 injections of TAA. **E:** Representative pictures of deletion PCR from DNA extracted on whole liver on HMGB1^{Flox} and HMGB1^{ΔMac} subjected to 21 days of BDL. **F:** Representative pictures of deletion PCR from DNA extracted on whole kidney on HMGB1^{Flox} and HMGB1^{ΔMac} subjected to 7 days of UUO. **G:** Representative pictures of deletion PCR from DNA extracted on whole heart on HMGB1^{Flox} and HMGB1^{ΔMac} subjected to 28 days of TAC. **H:** Representative pictures of deletion PCR from DNA extracted on whole liver on HMGB1^{Flox} and HMGB1^{ΔMac} under control conditions and housed at 30°C. **H:** Representative pictures of deletion PCR from DNA extracted on whole liver on HMGB1^{Flox} and HMGB1^{ΔMac} under basal conditions and housed at 30°C. **I:** Representative pictures of deletion PCR from DNA extracted on whole liver on HMGB1^{Flox} and HMGB1^{ΔMac} housed at 30°C and subjected to 21 days of BDL. **J:** Representative pictures of deletion PCR from DNA extracted on whole kidney on HMGB1^{Flox} and HMGB1^{ΔMac} housed at 30°C and subjected to 7 days of UUO. HMGB1: High mobility group box 1, CCL₄: Carbon Tetrachloride, TAA: Thioacetamide, BDL: Bile duct ligation, UUO: Unilateral Ureteral Obstruction, TAC: Transverse aortic constriction.

Supplementary Figure 2: Remarkable changes induced by thermoneutral housing. **A:** Comparison of HMGB1 circulating levels in wild-type mice housed at 20°C and 30°C determined by ELISA. **B-C:** Circulating ALT (**B**) and AST (**C**) levels in wild-type mice housed at 20°C and 30°C. **D:** Representative pictures of picosirius red staining of liver from wild-type mice housed at 20°C and 30°C. Statistical analysis was performed with Mann and

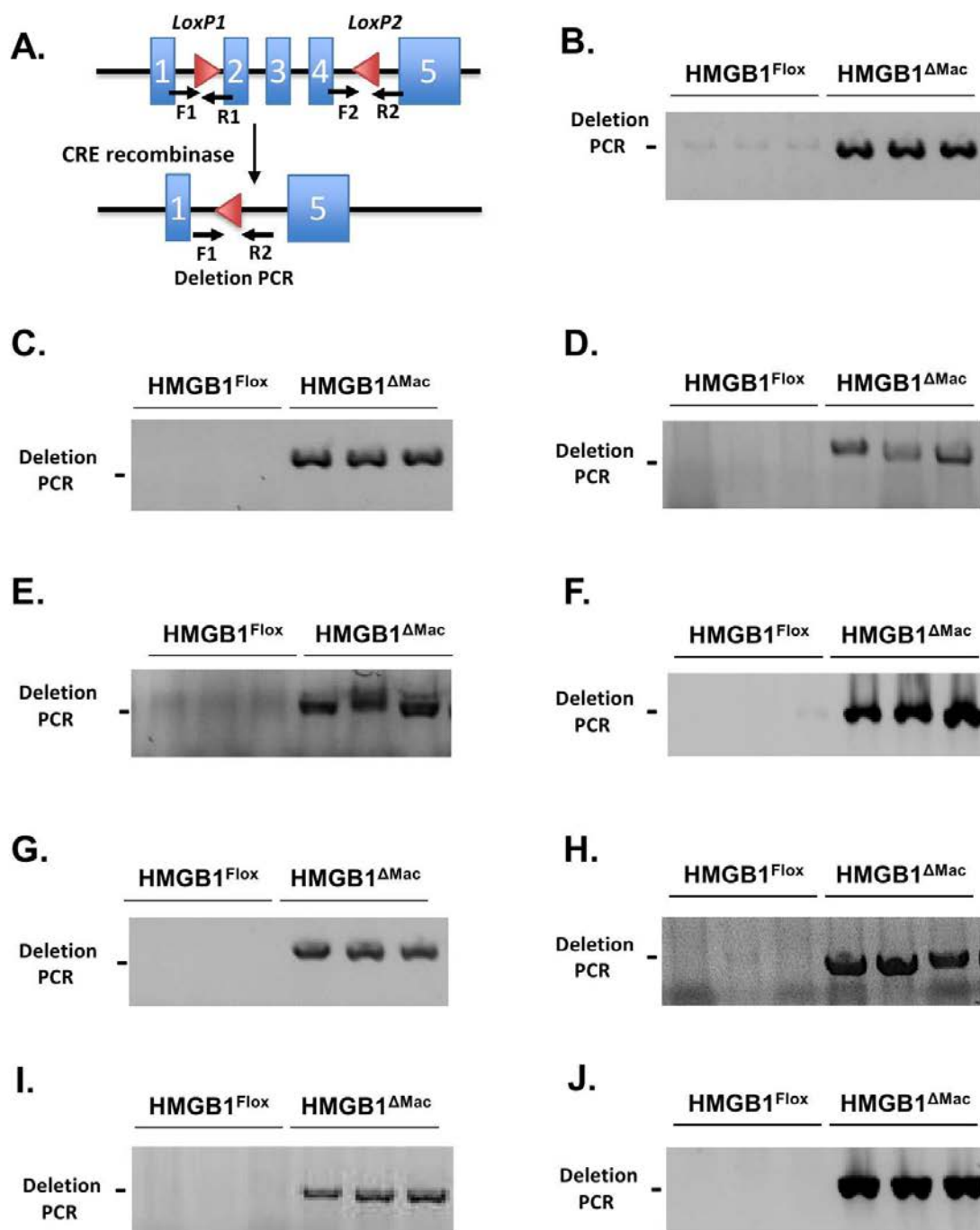
Whitney test. Data are expressed as means \pm SEM. n=5 in 20°C group; n=4 in 30°C group. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,001 versus 20°C vs 30°C. Scale bar 250um (D). HMGB1: high mobility group box 1, ALT: Alanine transaminase, AST: Aspartate transaminase.

Supplementary Figure 3: Thermoneutral housing effects during BDL and UUO. **A-B:** Circulating ALT (A) and AST (B) levels in HMGB1^{Flox} and HMGB1 ^{Δ Mac} mice subjected to BDL. **C-D:** HMGB1 circulating levels in HMGB1^{Flox} and HMGB1 ^{Δ Mac} mice subjected to BDL and UUO, a dotted line indicates the basal level of HMGB1 circulating levels (C). Statistical analysis was performed with Mann and Whitney analysis. Data are expressed as means \pm SEM. n=4 in HMGB1^{Flox}/basal group; n=3 HMGB1^{Mac}/basal group. n=5 in HMGB1^{Flox}/BDL group; n=7 HMGB1^{Mac}/BDL group; n=10 in HMGB1^{Flox}/UUO group; n=10 HMGB1^{Mac}/UUO group. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 versus 20°C vs 30°C. HMGB1: high mobility group box 1, BDL: Bile duct ligation, UUO: Unilateral Ureteral Obstruction, ALT: Alanine transaminase, AST: Aspartate transaminase.

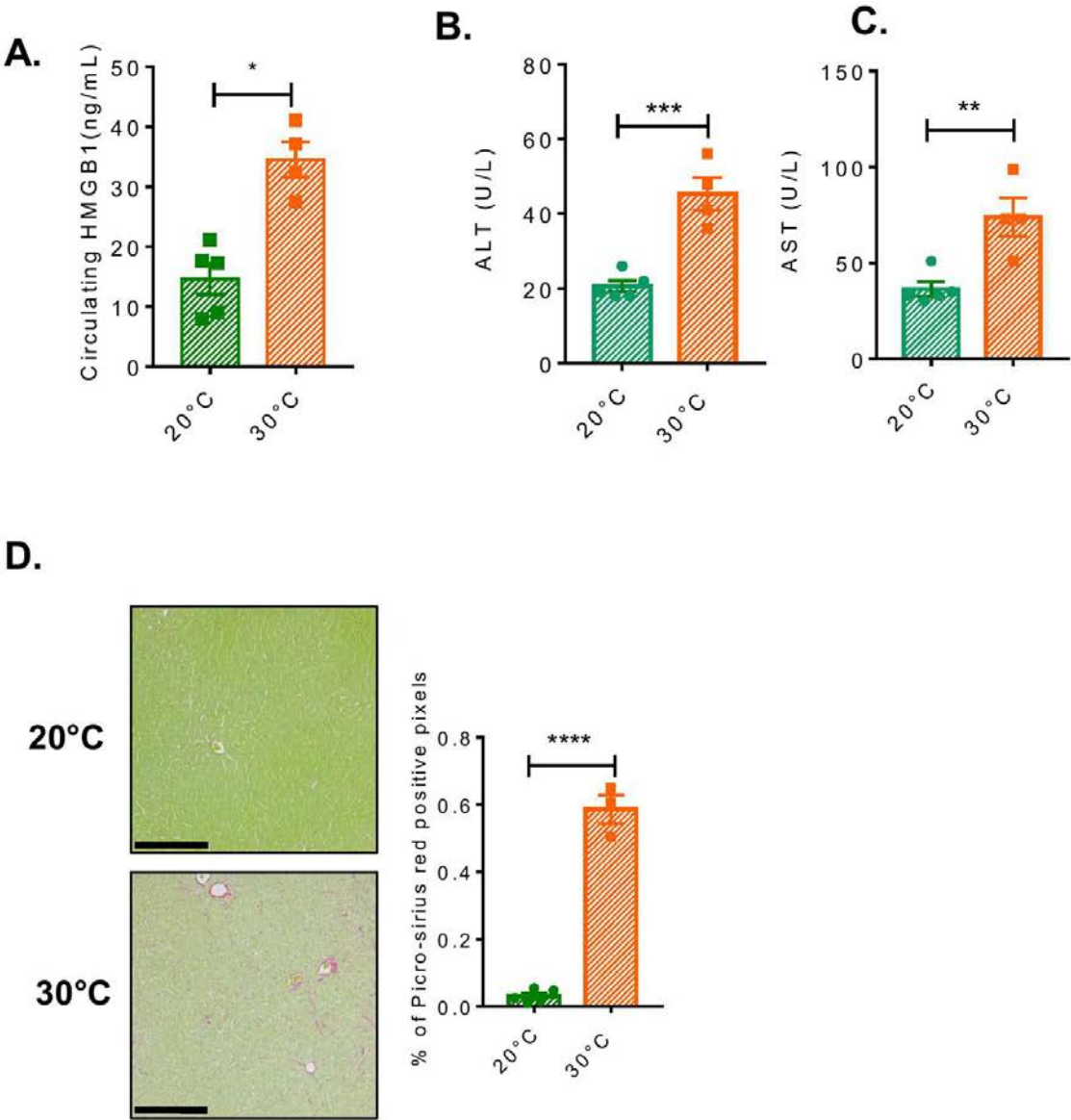
Supplementary Figure 4: Circulating levels of HMGB1 during fibrogenesis. **A:** Serum levels of HMGB1 determined by ELISA assay, in HMGB1^{Flox} and HMGB1 ^{Δ Mac} mice subjected to CCL4 treatment, a dotted line indicates the basal level. **B:** Serum levels determined by ELISA assay of HMGB1 in HMGB1^{Flox} and HMGB1 ^{Δ Mac} mice subjected to TAA treatment, a dotted line indicates basal level. **C:** Serum levels of HMGB1 determined by ELISA assay, in HMGB1^{Flox} and HMGB1 ^{Δ Mac} mice subjected to BDL, a dotted line indicates basal level. **D:** Serum levels of HMGB1 determined by ELISA assay, in HMGB1^{Flox} and HMGB1 ^{Δ Mac} mice subjected to UUO, a dotted line indicates basal level. **E:** Serum levels of HMGB1 determined by ELISA assay, in HMGB1^{Flox} and HMGB1 ^{Δ Mac} mice subjected to TAC, a dotted line indicates basal level. Statistical analysis was performed with Mann and Whitney test. Data are expressed as means \pm SEM. n=5 in HMGB1^{Flox}/Sham group; n=5 in HMGB1 ^{Δ Mac}/Sham group; n=12 in HMGB1^{Flox}/CCL₄ group; n=11 in HMGB1 ^{Δ Mac}/CCL₄ group;

n=6 in HMGB1^{Flox}/TAA group; n=11 in HMGB1^{ΔMac}/TAA group; n=3 in HMGB1^{Flox}/BDL group; n=7 in HMGB1^{ΔMac}/BDL group; n=12 in HMGB1^{Flox}/UUO group; n=10 in HMGB1^{ΔMac}/UUO group; n=9 in HMGB1^{Flox}/TAC group; n=10 in HMGB1^{ΔMac}/TAC group. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 versus toxin/surgery vs vehicle/sham HMGB1: high mobility group box 1, CCL₄: Carbon Tetrachloride, TAA: Thioacetamide, BDL: Bile duct ligation, UUO: Unilateral Ureteral Obstruction, TAC: Transverse aortic constriction.

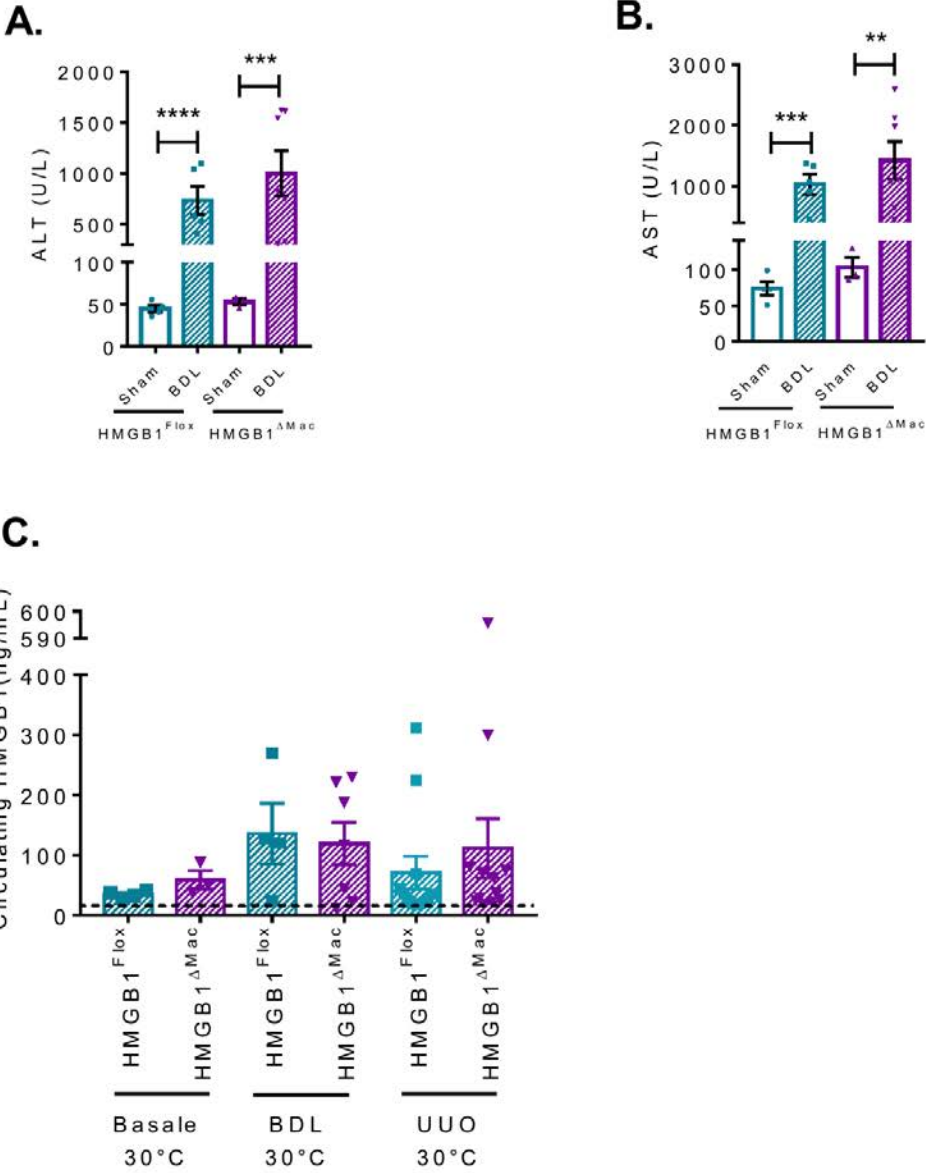
Supplementary Figure 1:



Supplementary Figure 2:

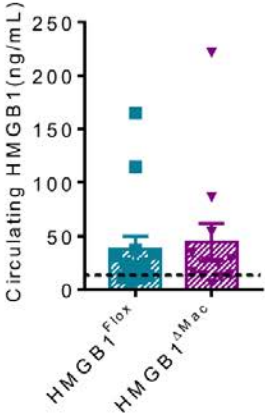


Supplementary Figure 3:

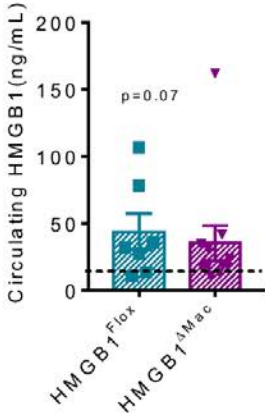


Supplementary Figure 4:

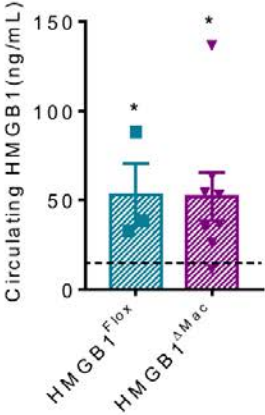
A.



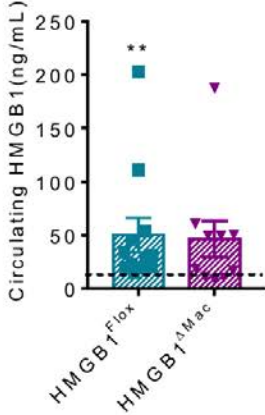
B.



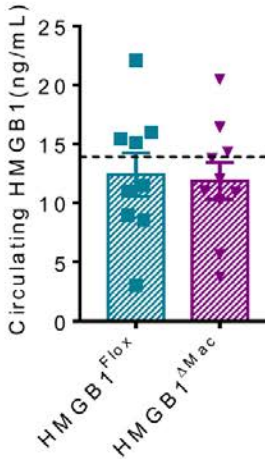
C.



D.



E.



IV. Discussion

A. Utilité d'HMGB1 dans les cellules différenciées

Au cours du développement, HMGB1 est un facteur nucléaire indispensable à la survie : la délétion germinale de cette protéine entraîne un retard de croissance sans malformation associé à un défaut de glyco-génolyse entraînant une hypoglycémie létale (Calogero et al., 1999). De façon intéressante, la délétion de cette protéine dans des hépatocytes différenciés ne permet pas de reproduire le phénotype hépatique du KO germinale (Huang et al., 2014; Huebener et al., 2014). Ces résultats suggèrent donc qu'HMGB1 pourrait jouer un rôle clef dans les cellules immatures au cours du développement embryonnaire mais aussi au cours de phénomène de régénération tissulaire en reprogrammant les cellules vers un état plus « immature », proche de l'état embryonnaire. Pour valider cette hypothèse, il serait intéressant d'étudier l'effet de la délétion d'HMGB1 dans un modèle classique de régénération hépatique, comme l'hépatectomie partielle (HP). Ce modèle d'HP est particulièrement intéressant puisqu'il permet d'induire la régénération hépatique, à partir des hépatocytes, sans nécrose ni inflammation (Michalopoulos, 2010).

Le rôle distinct d'HMGB1 en fonction du degré de maturité des cellules pourrait permettre d'expliquer, par exemple, les différences de résultats obtenus lors de l'étude du rôle d'HMGB1 dans la fonction mitochondriale. En effet, la première étude publiée suggère qu'HMGB1 joue un rôle capital dans la fonction mitochondriale dans un modèle de fibroblastes embryonnaires murins (Tang et al., 2011). Une étude ultérieure, *in vivo*, rapporte qu'HMGB1 n'a aucun rôle au niveau de la mitochondrie en utilisant un modèle de délétion d'HMGB1 dans les hépatocytes matures (Huebener et al., 2014). Ces résultats contradictoires pourraient peut-être s'expliquer en partie par le degré de maturité des cellules dans les modèles utilisés (MEF et hépatocytes).

B. Rôle(s) d'HMGB1 dans le tissu adipeux

De façon inattendue, nous avons mis en évidence qu'HMGB1 pourrait inhiber l'activité de la LDN dans l'hépatocyte *via* un mécanisme PPAR γ -dépendant. Cependant cet effet ne semble être observé que dans des contextes où les substrats sont abondants : l'inhibition de la LDN par HMGB1 pourrait ainsi permettre de limiter l'accumulation de lipides responsables d'une diminution de la sensibilité à l'insuline hépatique.

Comme HMGB1 est aussi exprimé au niveau du tissu adipeux, nous ne pouvons pas exclure que, comme dans l'hépatocyte, HMGB1 inhibe aussi la LDN adipocytaire. Or, l'inhibition génique de cette voie dans l'adipocyte est responsable d'une résistance à l'insuline systémique (Vijayakumar et al., 2017). Au contraire, la sur-activation de la LDN adipocytaire est associée à une augmentation de la masse grasse sans développement de résistance à l'insuline (Cao et al., 2008; Huo et al., 2012). Tous ces résultats suggèrent donc que la LDN adipocytaire aurait un effet protecteur sur la sensibilité à l'insuline systémique lors la progression de l'obésité.

Le rôle d'HMGB1 dans la régulation de la LDN adipocytaire reste encore à définir mais l'étude du modèle HMGB1 ^{Δ adipo} devrait permettre d'identifier les mécanismes mis en jeux dans ce contexte.

Cependant, au cours de l'étude de la délétion d'HMGB1 dans l'adipocyte, nous avons pu observer un retour de l'expression d'HMGB1, 12 semaines après le traitement TMX. Ces observations laissent penser qu'en plus d'un rôle éventuel sur la régulation de la LDN, HMGB1 pourrait jouer un rôle sur l'expansion ou la différenciation des adipocytes. L'effet d'HMGB1 sur ces phénomènes pourrait se faire à deux niveaux :

1/ Au niveau nucléaire, la présence d'HMGB1 pourrait limiter la différenciation ou la division des progéniteurs, limitant ainsi l'expansion du TA.

2/ Comme déjà démontré dans un contexte de lésion musculaire, une fois dans l'espace extracellulaire, HMGB1 peut interagir sur le recrutement de progéniteurs *via* un axe CXCR4/CXCL12 (Tirone et al., 2017). De façon intéressante, Yao et ses collaborateurs (Yao et al., 2014) ont démontré que le CXCR4 adipocytaire permettait de limiter l'expansion du tissu adipeux. Ainsi, nous supposons qu'HMGB1 pourrait aussi jouer un rôle *via* CXCR4 dans le recrutement des progéniteurs adipocytaires.

C. Inhibitions pharmacologiques, des résultats contradictoires ou logiques ?

Dans nos mains, le traitement à la GLY a un effet mineur sur la progression de la stéatose et de la fibrose alors que le traitement aux ICM semble réduire la progression de la stéatose et de l'inflammation induite par un régime HFD60%.

Le mode d'action différent de ces deux molécules peut expliquer les différences de réponse au traitement. En effet, les ICM vont inhiber les modifications post-traductionnelles d'HMGB1 et ainsi inhiber sa sécrétion (Lee et al., 2014). En d'autres termes, le traitement aux ICM bloque le transport nucléo-cytoplasmique d'HMGB1, séquestrant HMGB1 dans le noyau. L'étude de la délétion génique *in vivo* d'HMGB1 nous a permis de mettre en évidence qu'HMGB1 nucléaire pourrait limiter la progression de la stéatose en inhibant l'activité de la LDN. Pris tous ensemble ces résultats suggèrent que le traitement aux ICM, en séquestrant HMGB1 dans le noyau, pourrait renforcer son effet inhibiteur sur l'activité de la LDN hépatocytaire. Par ailleurs, le traitement à la GLY est connu pour inhiber l'activité cytokine d'HMGB1 circulant, sans effet sur le pool intracellulaire (Mollica et al., 2007). Ainsi, les résultats du traitement à la GLY semblent indiquer la contribution mineure d'HMGB1 circulant sur la progression de la stéatose hépatique.

Ainsi, dans l'hypothèse d'un transfert vers la clinique HMGB1 pourrait être une cible pertinente dans deux contextes :

1/ Au cours d'un épisode inflammatoire aigu comme une septicémie, l'utilisation de composés dérivés de la GLY pourraient permettre de limiter la réponse immunitaire médiée par HMGB1.

2/ Dans un contexte de thérapies anti-stéatose, l'utilisation de composés dérivés des ICM pourrait permettre de limiter l'accumulation de lipides dans le foie. Cependant, une telle approche pourrait entraîner certains effets indésirables. En effet, quel va être l'effet de ce traitement sur l'activité de la LDN adipocytaire et quelles seront les conséquences d'une potentielle inhibition de la LDN dans le foie et le TA sur l'homéostasie énergétique. De plus, le rôle nucléaire d'HMGB1 est peu étudié, nous ne pouvons donc pas exclure que la séquestration nucléaire d'HMGB1 soit à l'origine d'effets indésirables dépendants du type cellulaire. Enfin, vu l'action pléiotrope des ICM, un tel traitement est à risque d'induire un « état d'hypovigilance » immunitaire, pouvant entraîner un risque accru d'infection.

D. HMGB1 une alarmine métabolique, sensing de l'état énergétique

Au cours d'une mise à jeun de 24 heures nous avons pu mettre en évidence que les concentrations plasmatiques d'HMGB1 sont significativement augmentées comparativement aux animaux nourris, comme aussi décrit par Rickenbacher *et al.* (Rickenbacher *et al.*, 2014). De façon intéressante, les concentrations plasmatiques d'HMGB1 sont significativement augmentées lors de la mise à jeun chez les animaux HMGB1^{fl/fl} mais pas chez les animaux HMGB1^{Δhep} (**Fig 51**). Ces résultats suggèrent que les hépatocytes semblent être la source principale des taux circulants d'HMGB1 dans ce contexte. Ainsi, au cours du jeûne, en l'absence de nécrose et d'activation des macrophages, les hépatocytes pourraient être capables de sécréter activement HMGB1.

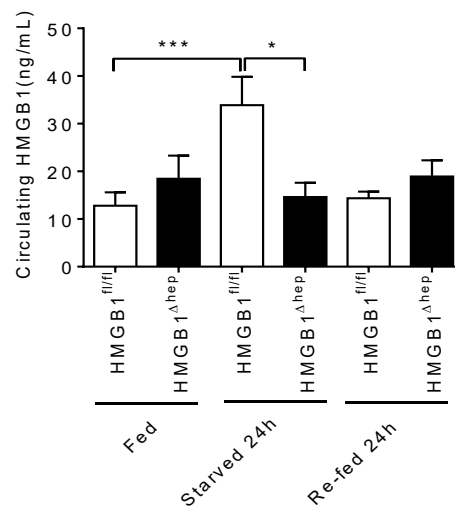


Figure 51 : Evolution des concentrations circulantes d'HMGB1 lors de la mise à jeun.

A l'état nourri les concentrations d'HMGB1 circulant sont comparables entre les animaux HMGB1^{fl/fl} (n=8) et HMGB1^{Δhep} (n=8). Lors de la mise à jeun pendant 24 heures (Starved 24h) les taux circulants sont significativement augmentés dans le groupe HMGB1^{fl/fl} (n=9) mais pas dans le groupe HMGB1^{Δhep} (n=8). Après un re-nourissage de 24 heures (Re-Fed 24h), les concentrations plasmatiques d'HMGB1 retournent à la valeur basale (HMGB1^{fl/fl} n=12, HMGB1^{Δhep} n=11). Les données sont exprimées en moyenne ± ESM. *p<0.05, ***p<0.001.

Au cours d'un régime hyper lipidique les concentrations plasmatiques d'HMGB1 sont significativement augmentées, par rapport au régime contrôle, mais ici, il n'y a pas de différence entre les animaux HMGB1^{fl/fl} et HMGB1^{Δhep} ce qui suggère, dans ce contexte, que les niveaux plasmatiques d'HMGB1 ne soient pas d'origine hépatocytaire.

Pour résumer, dans un contexte de carence énergétique *i.e.* la mise à jeun, l'augmentation des taux circulants est essentiellement due aux hépatocytes. Au contraire, dans un contexte où les substrats énergétiques sont abondants *i.e.* le HFD60% ou le re-nourissage, HMGB1 circulant ne provient pas de

l'hépatocyte. Ainsi, outre son rôle d'alarmine immunitaire nous posons l'hypothèse qu'HMGB1 pourrait être une « alarmine métabolique » responsable du sensing énergétique.

En parallèle de ces observations, nous avons mis en évidence qu'un traitement aigu à la rosiglitazone pendant 18 heures augmente significativement les concentrations plasmatiques d'HMGB1 (**Fig 52**). Les ligands endogènes de PPAR γ étant des dérivés lipidiques (Schupp and Lazar, 2010), la sécrétion d'HMGB1 pourrait donc être sous la dépendance d'un dérivé lipidique. Et dans le contexte de la mise à jeun, ce ligand pourrait provenir d'espèces lipidiques libérées au cours de la lipolyse du tissu adipeux, cependant ces résultats doivent être confirmés.

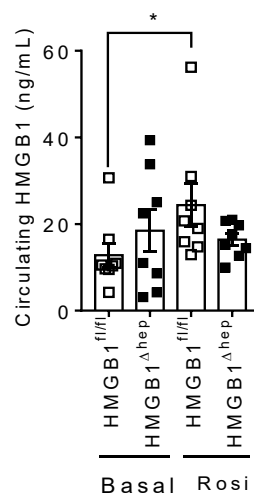


Figure 52 : Effet du traitement à la rosi sur les concentrations plasmatiques d'HMGB1.

Comparativement à l'état basal (HMGB1^{fl/fl} n=7 et HMGB1^{Δhep} n=8) le traitement à la rosi (25mg/kg) augmente significativement la concentration plasmatique d'HMGB1 chez les animaux HMGB1^{fl/fl} (n=8) mais pas chez les animaux HMGB1^{Δhep} (n=9). Données exprimées en moyenne ± ESM. *p<0.05.

Au cours de la mise à jeun, le foie sécrète de nombreux facteurs dont l'hépatokine FGF21 qui entre autres rôles biologiques, favorise l'utilisation des corps cétoniques par les tissus (Badman et al., 2009). De façon inattendue, il semble exister un lien entre HMGB1 hépatocytaire et la concentration plasmatique de FGF21. En effet, au cours d'une mise à jeun de 24 heures, les animaux HMGB1^{Δhep} présentent une diminution significative de la concentration plasmatique de FGF21 comparativement aux animaux contrôles (**Fig 53A**). Cette diminution du FGF21 circulant est associée à une diminution de l'expression génique de *fgf21* dans le foie (**Fig 53B**) pouvant expliquer la diminution des concentrations circulantes de cette hormone (Badman et al., 2009). L'expression de *fgf21* est sous la dépendance de PPAR α (Badman et al., 2007), ce qui peut laisser supposer un effet de HMGB1 sur l'activité de PPAR α au cours d'un jeûne de longue durée. Pour étudier l'interaction entre HMGB1 et PPAR α nous pouvons envisager dans un premier temps de mettre en place une approche pharmacologique reposant sur l'utilisation d'un agoniste spécifique de PPAR α les Fenofibrates. Dans

un second temps, et si les résultats s'avèrent concluants, nous pourrions envisager la génération d'un double KO hépatique HMGB1-PPAR α . En parallèle de cette approche pharmacologiques nous sommes en train de comparer, en collaboration avec l'équipe d'Hervé Guillou (INRA) à Toulouse, le métabolome hépatique des animaux HMGB1^{fl/fl} et HMGB1 ^{Δ hep}. L'étude de ce dernier nous permettra peut-être de dégager une signature caractéristique d'une voie métabolique.

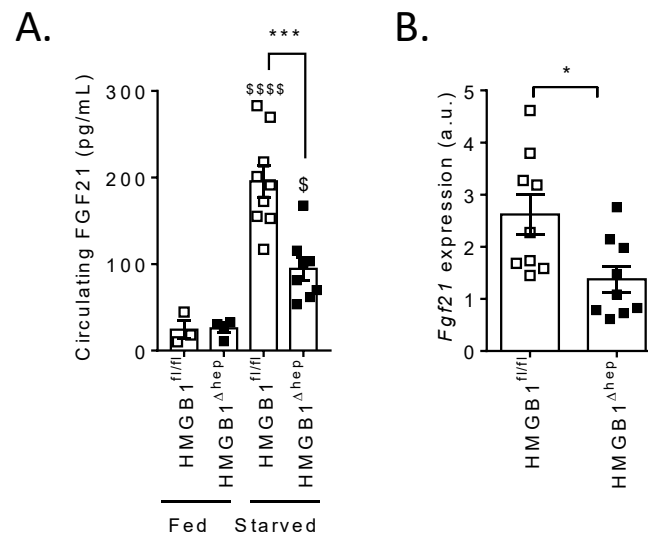


Figure 53 : La délétion d'HMGB1 dans l'hépatocyte diminue la sécrétion de FGF21.

Les concentrations circulantes de FGF21 sont mesurées par ELISA chez des souris HMGB1^{fl/fl} et HMGB1 ^{Δ hep} nourries (Fed, n=3 par génotype) ou mises à jeun 24 heures (Starved, n=9 par génotype) (A). L'expression génique de Fgf21 est mesurée par qPCR dans le foie d'animaux HMGB1^{fl/fl} (n=9) et HMGB1 ^{Δ hep} (n=9) mis à jeun 24 heures. \$ p<0.05, \$\$\$\$ p<0.0001 Starved vs Fed ; *** p<0.001 HMGB1^{fl/fl} vs HMGB1 ^{Δ hep}.

A la vue des résultats sur la mise à jeun, il semble qu'HMGB1 puisse réguler l'expression ou l'activité des facteurs de transcription PPAR α et PPAR γ en fonction de l'abondance des substrats énergétiques. Cette régulation pourrait faire intervenir des modifications d'interaction entre HMGB1 et la chromatine interaction qui est finement régulée par le niveau d'acétylation et/ou de méthylation d'HMGB1. Dans le noyau, la régulation de ces modifications post-traductionnelles se fait principalement par les histones déacétylases (HDAC) ou les histones déméthylases (HDM). Certaines données indiquent que les HDAC1, 4 (Evankovich et al., 2010) et la sirtuin1 (Rabadi et al., 2015) sont capables de déacétyler HMGB1, entraînant sa relocalisation cytoplasmique en vue de sa sécrétion. L'activité de la sirtuin1 étant augmentée au cours du jeûne (Zhu et al., 2013), nous posons l'hypothèse que cette augmentation soit à l'origine de l'accroissement des taux circulants d'HMGB1 au cours du jeûne. Des expériences où l'expression de la Sirtuine 1 est manipulée au cours du jeune, chez des animaux HMGB1^{fl/fl} et HMGB1 ^{Δ Hep}, sont actuellement à l'étude, pour essayer d'évaluer la contribution de la Sirtuine 1 dans la sécrétion d'HMGB1 au cours du jeune.

Dans le but de comprendre le rôle biologique d'HMGB1 activement sécrété au cours du jeûne, il paraît essentiel de trouver le(s) tissu(s) cible(s). Cependant, vu le mode d'action d'HMGB1 il est probable que ses effets biologiques soient médiés par des récepteurs de l'immunité, qui convergent vers la voie de signalisation NFκB. La comparaison de la phosphorylation d'effecteurs de cette voie, tel que p65, au cours d'un jeûne de 24 heures chez des animaux HMGB1^{fl/fl} ou HMGB1^{Δhep} dans des tissus classiquement étudiés au cours de la mise à jeun (foie, TA, muscle ou système nerveux central) permettrait de mettre en évidence le tissu cible d'HMGB1 sécrété au cours du jeûne. Si cette piste n'est pas concluante, nous pouvons imaginer réaliser un phosphoarray, criblant l'activation de nombreuses voies de signalisation, sur des préparations des tissus potentiellement cibles (Foie, tissu adipeux, muscles).

V. Annexes

A. Autres réalisations

Article : « Chronic apelin treatment improves hepatic lipid metabolism in obese and insulin-resistant mice by an indirect mechanism. », *Endocrine*, 2018.

Bertrand C, Pradère JP, Geoffre N, Deleruyelle S, Masri B, Personnaz J, Le Gonidec S, Batut A, Louche K, Moro C, Valet P, Castan-Laurell I.

Communication orale : « HMGB1 régule le développement de la stéatose hépatique », AFERO (Toulouse), 2016.

Communications affichées :

- « HMGB1 protein as a new regulator of liver *de novo* lipogenesis »

Jean Personnaz, Elsa Moreau, Aurélie Batut, Simon Deleruyelle, Cédric Moro, Robert F. Schwabe
Philippe Valet & Jean-Philippe Pradère.

LSS (Lausanne) 2017.

Keystone (Keystone), 2018.

- « Respective roles of ATGL and HSL on adipose tissue lipolysis-mediated control of glucose metabolism and insulin sensitivity. »

E. Mouisel, L. Monbrun, P. Morigny, J. Personnaz, M. Houssier, V. Barquissau, G. Tavernier, D. Langin.
EASD (Stockholm), 2015.

B. Annexe 1 : Liste des gènes significativement régulés par la délétion d'HMGB1 au cours de stress métaboliques

Gene name	fold change		
	HFD	STRV-6h/ Refeed 8H	STRV-6h
Sult1e1	137,30	11,35	34,30
Atp6v0d2	9,05	3,29	9,07
Sult2a7	6,49	4,17	3,50
Eid2	4,10	3,87	3,43
Snhg11	3,84	3,39	3,35
Fbxl16	3,61	4,55	2,54
Apoa4	3,25	3,41	4,86
Fam110c	2,86	2,01	2,39
Cenpp	2,83	2,01	2,17
Hist2h3c2	2,60	2,66	3,09
Hist1h4i	2,60	2,88	3,03
Mgmt	2,27	2,04	2,42

Tableau 10 : Gènes significativement up-régulés, au cours de différents stress métaboliques, par la délétion d'HMGB1 dans l'hépatocyte.

Gene name	fold change		
	HFD	STRV-6h/ Refeed 8H	STRV-6h
Adrb3	0,04	0,07	0,05
Serpine2	0,08	0,06	0,28
Olfm3	0,09	0,07	0,11
Aatk	0,09	0,35	0,42
Dct	0,10	0,14	0,24
Grin3b	0,13	0,33	0,47
Hsd3b5	0,13	0,47	0,25
Dcaf12l1	0,21	0,29	0,34
Zap70	0,22	0,20	0,18
Cyp7b1	0,22	0,42	0,44
Ihh	0,23	0,22	0,27
Gsdmd	0,25	0,35	0,41
Smim22	0,26	0,17	0,22
Slc22a7	0,26	0,18	0,25
Mycn	0,28	0,25	0,31
Nxpe2	0,29	0,36	0,35
Pclo	0,29	0,43	0,42
Tifa	0,30	0,40	0,42
Susd4	0,31	0,32	0,26
Plcx1	0,32	0,21	0,25
Hsbp1l1	0,35	0,34	0,38
Fmn1	0,35	0,28	0,44
Crygn	0,36	0,30	0,24
Mme	0,41	0,37	0,29
Cox7a1	0,42	0,35	0,28
Ppp1r9a	0,44	0,34	0,46
Smim1	0,44	0,33	0,35
Tmem218	0,47	0,42	0,40
Psg16	0,48	0,39	0,46
Rdh11	0,50	0,48	0,42
Hmgb1	0,10	0,50	0,13

Tableau 11 : Gènes significativement down-régulés, au cours de différents stress métaboliques, par la délétion d'HMGB1 dans l'hépatocyte.

VI. Bibliographie

Abu-Elheiga, L. (2001). Continuous Fatty Acid Oxidation and Reduced Fat Storage in Mice Lacking Acetyl-CoA Carboxylase 2. *Science* 291, 2613–2616.

Abu-Elheiga, L., Jayakumar, A., Baldini, A., Chirala, S.S., and Wakil, S.J. (1995). Human acetyl-CoA carboxylase: characterization, molecular cloning, and evidence for two isoforms. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92, 4011–4015.

Abu-Elheiga, L., Brinkley, W.R., Zhong, L., Chirala, S.S., Woldegiorgis, G., and Wakil, S.J. (2000). The subcellular localization of acetyl-CoA carboxylase 2. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97, 1444–1449.

Abu-Elheiga, L., Oh, W., Kordari, P., and Wakil, S.J. (2003). Acetyl-CoA carboxylase 2 mutant mice are protected against obesity and diabetes induced by high-fat/high-carbohydrate diets. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100, 10207–10212.

Abu-Elheiga, L., Matzuk, M.M., Kordari, P., Oh, W., Shaikenov, T., Gu, Z., and Wakil, S.J. (2005). Mutant mice lacking acetyl-CoA carboxylase 1 are embryonically lethal. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102, 12011–12016.

Ahmad, F., Ahmad, P.M., Pieretti, L., and Watters, G.T. (1978). Purification and subunit structure of rat mammary gland acetyl coenzyme A carboxylase. *J. Biol. Chem.* 253, 1733–1737.

Ahrens, M., Ammerpohl, O., von Schönfels, W., Kolarova, J., Bens, S., Itzel, T., Teufel, A., Herrmann, A., Brosch, M., Hinrichsen, H., et al. (2013). DNA Methylation Analysis in Nonalcoholic Fatty Liver Disease Suggests Distinct Disease-Specific and Remodeling Signatures after Bariatric Surgery. *Cell Metab.* 18, 296–302.

Alenghat, T., Meyers, K., Mullican, S.E., Leitner, K., Adeniji-Adele, A., Avila, J., Bućan, M., Ahima, R.S., Kaestner, K.H., and Lazar, M.A. (2008). Nuclear receptor corepressor and histone deacetylase 3 govern circadian metabolic physiology. *Nature* 456, 997–1000.

Andersson, U., Wang, H., Palmblad, K., Aveberger, A.-C., Bloom, O., Erlandsson-Harris, H., Janson, A., Kokkola, R., Zhang, M., Yang, H., et al. (2000). High Mobility Group 1 Protein (Hmg-1) Stimulates Proinflammatory Cytokine Synthesis in Human Monocytes. *J. Exp. Med.* 192, 565–570.

Andreeva, L., Hiller, B., Kostrewa, D., Lässig, C., de Oliveira Mann, C.C., Jan Drexler, D., Maiser, A., Gaidt, M., Leonhardt, H., Hornung, V., et al. (2017). cGAS senses long and HMGB/TFAM-bound U-turn DNA by forming protein–DNA ladders. *Nature*.

Antoine, D.J., Williams, D.P., Kipar, A., Jenkins, R.E., Regan, S.L., Sathish, J.G., Kitteringham, N.R., and Park, B.K. (2009). High-Mobility Group Box-1 Protein and Keratin-18, Circulating Serum Proteins Informative of Acetaminophen-Induced Necrosis and Apoptosis In Vivo. *Toxicol. Sci.* *112*, 521–531.

Antoine, D.J., Dear, J.W., Lewis, P.S., Platt, V., Coyle, J., Masson, M., Thanacoody, R.H., Gray, A.J., Webb, D.J., Moggs, J.G., et al. (2013). Mechanistic biomarkers provide early and sensitive detection of acetaminophen-induced acute liver injury at first presentation to hospital. *Hepatology* *58*, 777–787.

Apfel, R., Benbrook, D., Lernhardt, E., Ortiz, M.A., Salbert, G., and Pfahl, M. (1994). A novel orphan receptor specific for a subset of thyroid hormone-responsive elements and its interaction with the retinoid/thyroid hormone receptor subfamily. *Mol. Cell. Biol.* *14*, 7025–7035.

Arrigo, T., Chirico, V., Salpietro, V., Munafò, C., Ferraù, V., Gitto, E., Lacquaniti, A., and Salpietro, C. (2013). High-mobility group protein B1: a new biomarker of metabolic syndrome in obese children. *Eur. J. Endocrinol.* *168*, 631–638.

Arturi, F., Succurro, E., Procopio, C., Pedace, E., Mannino, G.C., Lugarà, M., Procopio, T., Andreozzi, F., Sciacqua, A., Hribal, M.L., et al. (2011). Nonalcoholic Fatty Liver Disease Is Associated with Low Circulating Levels of Insulin-Like Growth Factor-I. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *96*, E1640–E1644.

Auberger, P., Falquerho, L., Contreres, J.O., Pages, G., Cam, G.L., Rossi, B., and Cam, A.L. (1989). Characterization of a natural inhibitor of the insulin receptor tyrosine kinase: cDNA cloning, purification, and anti-mitogenic activity. *Cell* *58*, 631–640.

Badman, M.K., Pissios, P., Kennedy, A.R., Koukos, G., Flier, J.S., and Maratos-Flier, E. (2007). Hepatic Fibroblast Growth Factor 21 Is Regulated by PPAR α and Is a Key Mediator of Hepatic Lipid Metabolism in Ketotic States. *Cell Metab.* *5*, 426–437.

Badman, M.K., Koester, A., Flier, J.S., Kharitonov, A., and Maratos-Flier, E. (2009). Fibroblast Growth Factor 21-Deficient Mice Demonstrate Impaired Adaptation to Ketosis. *Endocrinology* *150*, 4931–4940.

Bae, J.-S., Oh, A.-R., Lee, H.-J., Ahn, Y., and Cha, J.-Y. (2016). Hepatic Elovl6 gene expression is regulated by the synergistic action of ChREBP and SREBP-1c. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *478*, 1060–1066.

- Bagherpoor, A.J., Dolezalova, D., Barta, T., Kučírek, M., Sani, S.A., Ešner, M., Kunova Bosakova, M., Vinarský, V., Peskova, L., Hampl, A., et al. (2017). Properties of Human Embryonic Stem Cells and Their Differentiated Derivatives Depend on Nonhistone DNA-Binding HMGB1 and HMGB2 Proteins. *Stem Cells Dev.* 26, 328–340.
- Beer, N.L., Tribble, N.D., McCulloch, L.J., Roos, C., Johnson, P.R.V., Orho-Melander, M., and Gloyn, A.L. (2009). The P446L variant in GCKR associated with fasting plasma glucose and triglyceride levels exerts its effect through increased glucokinase activity in liver. *Hum. Mol. Genet.* 18, 4081–4088.
- Beigneux, A.P., Kosinski, C., Gavino, B., Horton, J.D., Skarnes, W.C., and Young, S.G. (2004). ATP-Citrate Lyase Deficiency in the Mouse. *J. Biol. Chem.* 279, 9557–9564.
- Benhamouche, S., Decaens, T., Godard, C., Chambrey, R., Rickman, D.S., Moinard, C., Vasseur-Cognet, M., Kuo, C.J., Kahn, A., Perret, C., et al. (2006). Apc Tumor Suppressor Gene Is the “Zonation-Keeper” of Mouse Liver. *Dev. Cell* 10, 759–770.
- Bernard, C. (1813-1878) A. du texte (1853). Nouvelle fonction du foie considéré comme organe producteur de matière sucrée chez l’homme et les animaux / par M. Claude Bernard,...
- Bianchi, M., Beltrame, M., and Paonessa, G. (1989). Specific recognition of cruciform DNA by nuclear protein HMG1. *Science* 243, 1056–1059.
- Blom, W., and Scholte, H. (1981). Acetyl-CoA Carboxylase Deficiency: An Inborn Error of de Novo Fatty Acid Synthesis. *N. Engl. J. Med.* 305, 465–466.
- Blomhoff, R., and Blomhoff, H.K. (2005). Overview of retinoid metabolism and function. *J. Neurobiol.* 66, 606–630.
- Blondonnet, R., Audard, J., Belville, C., Clairefond, G., Lutz, J., Bouvier, D., Roszyk, L., Gross, C., Lavergne, M., Fournet, M., et al. (2017). RAGE inhibition reduces acute lung injury in mice. *Sci. Rep.* 7, 7208.
- Blott, E.J., and Griffiths, G.M. (2002). Secretory lysosomes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3, 122–131.
- Bonaldi Tiziana, Talamo, F., Scaffidi, P., Ferrera, D., Porto, A., Bachi, A., Rubartelli, A., Agresti, A., and Bianchi, M. (2003). Monocytic cells hyperacetylate chromatin protein HMGB1 to redirect it towards secretion. *EMBO J.* 22, 5551–5560.

- Boone, A.N., Chan, A., Kulpa, J.E., and Brownsey, R.W. (2000). Bimodal Activation of Acetyl-CoA Carboxylase by Glutamate. *J. Biol. Chem.* 275, 10819–10825.
- Boonyaratanakornkit, V., Melvin, V., Prendergast, P., Altmann, M., Ronfani, L., Bianchi, M.E., Taraseviciene, L., Nordeen, S.K., Allegretto, E.A., and Edwards, D.P. (1998). High-Mobility Group Chromatin Proteins 1 and 2 Functionally Interact with Steroid Hormone Receptors To Enhance Their DNA Binding In Vitro and Transcriptional Activity in Mammalian Cells. *Mol. Cell. Biol.* 18, 4471–4487.
- Bostrom, P. (2005). Cytosolic Lipid Droplets Increase in Size by Microtubule-Dependent Complex Formation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 25, 1945–1951.
- Boulware, S.D., Tamborlane, W.V., Rennert, N.J., Gesundheit, N., and Sherwin, R.S. (1994). Comparison of the metabolic effects of recombinant human insulin-like growth factor-I and insulin. Dose-response relationships in healthy young and middle-aged adults. *J. Clin. Invest.* 93, 1131–1139.
- Braeuning, A., Ittrich, C., Köhle, C., Hailfinger, S., Bonin, M., Buchmann, A., and Schwarz, M. (2006). Differential gene expression in periportal and perivenous mouse hepatocytes. *FEBS J.* 273, 5051–5061.
- Braissant, O., Foufelle, F., Scotto, C., Dauça, M., and Wahli, W. (1996). Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR-alpha, -beta, and -gamma in the adult rat. *Endocrinology* 137, 354–366.
- Brickman, J.M., Adam, M., and Ptashne, M. (1999). Interactions between an HMG-1 protein and members of the Rel family. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96, 10679–10683.
- Brindle, N.P., Zammit, V.A., and Pogson, C.I. (1985). Regulation of carnitine palmitoyltransferase activity by malonyl-CoA in mitochondria from sheep liver, a tissue with a low capacity for fatty acid synthesis. *Biochem. J.* 232, 177–182.
- Brinkmann, V. (2004). Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria. *Science* 303, 1532–1535.
- Brown, M.S., and Goldstein, J.L. (2008). Selective versus Total Insulin Resistance: A Pathogenic Paradox. *Cell Metab.* 7, 95–96.
- Brunt, E.M., Janney, C.G., Bisceglie, A.M.D., Neuschwander-Tetri, B.A., and Bacon, B.R. (1999). Nonalcoholic steatohepatitis: a proposal for grading and staging the histological lesions. *Am. J. Gastroenterol.* 94, 2467–2474.

- Bugianesi, E., Gastaldelli, A., Vanni, E., Gambino, R., Cassader, M., Baldi, S., Ponti, V., Pagano, G., Ferrannini, E., and Rizzetto, M. (2005). Insulin resistance in non-diabetic patients with non-alcoholic fatty liver disease: sites and mechanisms. *Diabetologia* 48, 634–642.
- Bulankina, A.V., Deggerich, A., Wenzel, D., Mutenda, K., Wittmann, J.G., Rudolph, M.G., Burger, K.N.J., and Höning, S. (2009). TIP47 functions in the biogenesis of lipid droplets. *J. Cell Biol.* 185, 641–655.
- Bürger, M., Zimmermann, T.J., Kondoh, Y., Stege, P., Watanabe, N., Osada, H., Waldmann, H., and Vetter, I.R. (2012). Crystal structure of the predicted phospholipase LYPLAL1 reveals unexpected functional plasticity despite close relationship to acyl protein thioesterases. *J. Lipid Res.* 53, 43–50.
- Bustin, M. (2001). Chromatin unfolding and activation by HMGN* chromosomal proteins. 7.
- Bustin, M., and Neihart, N.K. (1979). Antibodies against chromosomal HMG proteins stain the cytoplasm of mammalian cells. *Cell* 16, 181–189.
- Buzzetti, E., Pinzani, M., and Tsochatzis, E.A. (2016). The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Metabolism* 65, 1038–1048.
- Calogero, S., Grassi, F., Aguzzi, A., Voigtländer, T., Ferrier, P., Ferrari, S., and Bianchi, M.E. (1999). The lack of chromosomal protein Hmg1 does not disrupt cell growth but causes lethal hypoglycaemia in newborn mice. *Nat. Genet.* 22, 276–280.
- Camps, L., Reina, M., Llobera, M., Bengtsson-Olivecrona, G., Olivecrona, T., and Vilaró, S. (1991). Lipoprotein lipase in lungs, spleen, and liver: synthesis and distribution. *J. Lipid Res.* 32, 1877–1888.
- Canbay, A., Feldstein, A.E., Higuchi, H., Werneburg, N., Grambihler, A., Bronk, S.F., and Gores, G.J. (2003). Kupffer cell engulfment of apoptotic bodies stimulates death ligand and cytokine expression. *Hepatology* 38, 1188–1198.
- Cao, H., Gerhold, K., Mayers, J.R., Wiest, M.M., Watkins, S.M., and Hotamisligil, G.S. (2008). Identification of a lipokine, a lipid hormone linking adipose tissue to systemic metabolism. *Cell* 134, 933–944.
- Cariou, B., Zair, Y., Staels, B., and Bruckert, E. (2011). Effects of the New Dual PPAR α / δ Agonist GFT505 on Lipid and Glucose Homeostasis in Abdominally Obese Patients With Combined Dyslipidemia or Impaired Glucose Metabolism. *Diabetes Care* 34, 2008–2014.

Cariou, B., Hanf, R., Lambert-Porcheron, S., Zaïr, Y., Sauvinet, V., Noël, B., Flet, L., Vidal, H., Staels, B., and Laville, M. (2013). Dual Peroxisome Proliferator–Activated Receptor α/δ Agonist GFT505 Improves Hepatic and Peripheral Insulin Sensitivity in Abdominally Obese Subjects. *Diabetes Care* 36, 2923–2930.

Casado, M., Vallet, V.S., Kahn, A., and Vaulont, S. (1999). Essential Role in Vivo of Upstream Stimulatory Factors for a Normal Dietary Response of the Fatty Acid Synthase Gene in the Liver. *J. Biol. Chem.* 274, 2009–2013.

Catena, R., Escoffier, E., Caron, C., Khochbin, S., Martianov, I., and Davidson, I. (2009). HMGB4, a Novel Member of the HMGB Family, Is Preferentially Expressed in the Mouse Testis and Localizes to the Basal Pole of Elongating Spermatids¹. *Biol. Reprod.* 80, 358–366.

Cha, S.H., Hu, Z., and Lane, M.D. (2004). Long-term effects of a fatty acid synthase inhibitor on obese mice: food intake, hypothalamic neuropeptides, and UCP3. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 317, 301–308.

Chakrabarti, P., Kim, J.Y., Singh, M., Shin, Y.-K., Kim, J., Kumbrink, J., Wu, Y., Lee, M.-J., Kirsch, K.H., Fried, S.K., et al. (2013). Insulin Inhibits Lipolysis in Adipocytes via the Evolutionarily Conserved mTORC1-Egr1-ATGL-Mediated Pathway. *Mol. Cell. Biol.* 33, 3659–3666.

Chakravarthy, M.V., Pan, Z., Zhu, Y., Tordjman, K., Schneider, J.G., Coleman, T., Turk, J., and Semenkovich, C.F. (2005). “New” hepatic fat activates PPAR α to maintain glucose, lipid, and cholesterol homeostasis. *Cell Metab.* 1, 309–322.

Chakravarthy, M.V., Lodhi, I.J., Yin, L., Malapaka, R.R.V., Xu, H.E., Turk, J., and Semenkovich, C.F. (2009). Identification of a Physiologically Relevant Endogenous Ligand for PPAR α in Liver. *Cell* 138, 476–488.

Chambers, J.C., Zhang, W., Sehmi, J., Li, X., Wass, M.N., Van der Harst, P., Holm, H., Sanna, S., Kavousi, M., Baumeister, S.E., et al. (2011). Genome-wide association study identifies loci influencing concentrations of liver enzymes in plasma. *Nat. Genet.* 43, 1131–1138.

Chen, J.D., and Evans, R.M. (1995). A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors. *Nature* 377, 454.

Chen, W.-W., Li, L., Yang, G.-Y., Li, K., Qi, X.-Y., Zhu, W., Tang, Y., Liu, H., and Boden, G. (2008). Circulating FGF-21 Levels in Normal Subjects and in Newly Diagnose Patients with Type 2 Diabetes Mellitus. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* 116, 65–68.

- Cherukuri, S., Hock, R., Ueda, T., Catez, F., Rochman, M., and Bustin, M. (2008). Cell Cycle-dependent Binding of HMGN Proteins to Chromatin. *Mol. Biol. Cell* *19*, 1816–1824.
- Chiew, A.L., Gluud, C., Brok, J., and Buckley, N.A. (2018). Interventions for paracetamol (acetaminophen) overdose. In *The Cochrane Library*, (John Wiley & Sons, Ltd), p.
- Cho, W., Koo, J.Y., Park, Y., Oh, K., Lee, S., Song, J.-S., Bae, M.A., Lim, D., Lee, D.-S., and Park, S.B. (2017). Treatment of Sepsis Pathogenesis with High Mobility Group Box Protein 1-Regulating Anti-inflammatory Agents. *J. Med. Chem.* *60*, 170–179.
- Choi, C.S., Savage, D.B., Kulkarni, A., Yu, X.X., Liu, Z.-X., Morino, K., Kim, S., Distefano, A., Samuel, V.T., Neschen, S., et al. (2007). Suppression of Diacylglycerol Acyltransferase-2 (DGAT2), but Not DGAT1, with Antisense Oligonucleotides Reverses Diet-induced Hepatic Steatosis and Insulin Resistance. *J. Biol. Chem.* *282*, 22678–22688.
- Choi, K.-C., Oh, S.-Y., Kang, H.-B., Lee, Y.-H., Haam, S., Kim, H.-I., Kim, K., Ahn, Y.-H., Kim, K.-S., and Yoon, H.-G. (2008). The functional relationship between co-repressor N-CoR and SMRT in mediating transcriptional repression by thyroid hormone receptor α . *Biochem. J.* *411*, 19–26.
- Chow, J.D.Y., Lawrence, R.T., Healy, M.E., Dominy, J.E., Liao, J.A., Breen, D.S., Byrne, F.L., Kenwood, B.M., Lackner, C., Okutsu, S., et al. (2014). Genetic inhibition of hepatic acetyl-CoA carboxylase activity increases liver fat and alters global protein acetylation. *Mol. Metab.* *3*, 419–431.
- Clausen, B.E., Burkhardt, C., Reith, W., Renkawitz, R., and Förster, I. (1999). Conditional gene targeting in macrophages and granulocytes using LysMcre mice. *Transgenic Res.* *8*, 265–277.
- Cohen, J.C., Horton, J.D., and Hobbs, H.H. (2011). Human Fatty Liver Disease: Old Questions and New Insights. *Science* *332*, 1519–1523.
- Cookson, B.T., and Brennan, M.A. (2001). Pro-inflammatory programmed cell death. *Trends Microbiol.* *9*, 113–114.
- Cotter, D.G., Ercal, B., Huang, X., Leid, J.M., d’Avignon, D.A., Graham, M.J., Dietzen, D.J., Brunt, E.M., Patti, G.J., and Crawford, P.A. (2014). Ketogenesis prevents diet-induced fatty liver injury and hyperglycemia. *J. Clin. Invest.* *124*, 5175–5190.
- Crispe, I.N. (2016). Hepatocytes as Immunological Agents. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *196*, 17–21.

Das, D., and Scovell, W.M. (2001). The Binding Interaction of HMG-1 with the TATA-binding Protein/TATA Complex. *J. Biol. Chem.* 276, 32597–32605.

Dashti, N., Gandhi, M., Liu, X., Lin, X., and Segrest, J.P. (2002). The N-Terminal 1000 Residues of Apolipoprotein B Associate with Microsomal Triglyceride Transfer Protein to Create a Lipid Transfer Pocket Required for Lipoprotein Assembly. *Biochemistry (Mosc.)* 41, 6978–6987.

Davé, S.H., Tilstra, J.S., Matsuoka, K., Li, F., DeMarco, R.A., Beer-Stolz, D., Sepulveda, A.R., Fink, M.P., Lotze, M.T., and Plevy, S.E. (2009). Ethyl pyruvate decreases HMGB1 release and ameliorates murine colitis. *J. Leukoc. Biol.* 86, 633–643.

Davis, K., Banerjee, S., Friggeri, A., Bell, C., Abraham, E., and Zerfaoui, M. (2011). Poly(ADP-Ribosyl)ation of High Mobility Group Box 1 (HMGB1) Protein Enhances Inhibition of Efferocytosis. *Mol. Med.* 11.

Day, C.P., and James, O.F.W. (1998). Steatohepatitis: A tale of two “hits”? *Gastroenterology* 114, 842–845.

Decuypere, J.-P., Parys, J.B., and Bultynck, G. (2012). Regulation of the Autophagic Bcl-2/Beclin 1 Interaction. *Cells* 1, 284–312.

Desvergne, B., and Wahli, W. (1999). Peroxisome Proliferator-Activated Receptors: Nuclear Control of Metabolism. *Endocr. Rev.* 20, 649–688.

Diana, F., Sgarra, R., Manfioletti, G., Rustighi, A., Poletto, D., Sciortino, M.T., Mastino, A., and Giancotti, V. (2001). A Link between Apoptosis and Degree of Phosphorylation of High Mobility Group A1a Protein in Leukemic Cells. *J. Biol. Chem.* 276, 11354–11361.

Diehl, A.M., and Day, C. (2017). Cause, Pathogenesis, and Treatment of Nonalcoholic Steatohepatitis. *N. Engl. J. Med.* 377, 2063–2072.

Ding, B.-S., Nolan, D.J., Butler, J.M., James, D., Babazadeh, A.O., Rosenwaks, Z., Mittal, V., Kobayashi, H., Shido, K., Lyden, D., et al. (2010). Inductive angiocrine signals from sinusoidal endothelium are required for liver regeneration. *Nature* 468, 310–315.

Ding, E.L., Song, Y., Manson, J.E., Hunter, D.J., Lee, C.C., Rifai, N., Buring, J.E., Gaziano, J.M., and Liu, S. (2009). Sex Hormone-Binding Globulin and Risk of Type 2 Diabetes in Women and Men. *N. Engl. J. Med.* 361, 1152–1163.

Disney, J.E. (1989). High-mobility group protein HMG-I localizes to G/Q- and C-bands of human and mouse chromosomes. *J. Cell Biol.* *109*, 1975–1982.

Ditsworth, D., Zong, W.-X., and Thompson, C.B. (2007). Activation of Poly(ADP)-ribose Polymerase (PARP-1) Induces Release of the Pro-inflammatory Mediator HMGB1 from the Nucleus. *J. Biol. Chem.* *282*, 17845–17854.

Doherty, M.J., Moorhead, G., Morrice, N., Cohen, P., and Cohen, P.T. (1995). Amino acid sequence and expression of the hepatic glycogen-binding (GL)-subunit of protein phosphatase-1. *FEBS Lett.* *375*, 294–298.

Donnelly, K.L., Smith, C.I., Schwarzenberg, S.J., Jessurun, J., Boldt, M.D., and Parks, E.J. (2005). Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J. Clin. Invest.* *115*, 1343.

Duncan, A.W. (2013). Aneuploidy, polyploidy and ploidy reversal in the liver. *Semin. Cell Dev. Biol.* *24*, 347–356.

Ebert, T., Bachmann, A., Lössner, U., Kratzsch, J., Blüher, M., Stumvoll, M., and Fasshauer, M. (2009). Serum levels of angiopoietin-related growth factor in diabetes mellitus and chronic hemodialysis. *Metab. - Clin. Exp.* *58*, 547–551.

Elbrecht, A., Chen, Y., Cullinan, C.A., Hayes, N., Leibowitz, M.D., Moller, D.E., and Berger, J. (1996). Molecular Cloning, Expression and Characterization of Human Peroxisome Proliferator Activated Receptors g1 and g2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *224*, 7.

Elshourbagy, N.A., Near, J.C., Kmetz, P.J., Wells, T.N.C., Groot, P.H.E., Saxty, B.A., Hughes, S.A., Franklin, M., and Gloger, I.S. (1992). Cloning and expression of a human ATP-citrate lyase cDNA. *Eur. J. Biochem.* *204*, 491–499.

Evankovich, J., Cho, S.W., Zhang, R., Cardinal, J., Dhupar, R., Zhang, L., Klune, J.R., Zlotnicki, J., Billiar, T., and Tsung, A. (2010). High Mobility Group Box 1 Release from Hepatocytes during Ischemia and Reperfusion Injury Is Mediated by Decreased Histone Deacetylase Activity. *J. Biol. Chem.* *285*, 39888–39897.

Fabbrini, E., Magkos, F., Mohammed, B.S., Pietka, T., Abumrad, N.A., Patterson, B.W., Okunade, A., and Klein, S. (2009). Intrahepatic fat, not visceral fat, is linked with metabolic complications of obesity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 15430–15435.

Farrelly, D., Brown, K.S., Tieman, A., Ren, J., Lira, S.A., Hagan, D., Gregg, R., Mookhtiar, K.A., and Hariharan, N. (1999). Mice mutant for glucokinase regulatory protein exhibit decreased liver glucokinase: A sequestration mechanism in metabolic regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *96*, 14511–14516.

Fedele, M., Pierantoni, G.M., Berlingieri, M.T., Battista, S., Baldassarre, G., Munshi, N., Dentice, M., Thanos, D., Santoro, M., Viglietto, G., et al. (2001). Overexpression of Proteins HMGA1 Induces Cell Cycle Deregulation and Apoptosis in Normal Rat Thyroid Cells. *Cancer Res.* *61*, 4583–4590.

Fedele, M., Fidanza, V., Battista, S., Pentimalli, F., Klein-Szanto, A.J.P., Visone, R., De Martino, I., Curcio, A., Morisco, C., Del Vecchio, L., et al. (2006). Haploinsufficiency of the Hmga1 Gene Causes Cardiac Hypertrophy and Myelo-Lymphoproliferative Disorders in Mice. *Cancer Res.* *66*, 2536–2543.

Feige, J.N., Gelman, L., Tudor, C., Engelborghs, Y., Wahli, W., and Desvergne, B. (2005). Fluorescence Imaging Reveals the Nuclear Behavior of Peroxisome Proliferator-activated Receptor/Retinoid X Receptor Heterodimers in the Absence and Presence of Ligand. *J. Biol. Chem.* *280*, 17880–17890.

Feng, D., Liu, T., Sun, Z., Bugge, A., Mullican, S.E., Alenghat, T., Liu, X.S., and Lazar, M.A. (2011). A Circadian Rhythm Orchestrated By Histone Deacetylase 3 Controls Hepatic Lipid Metabolism. *Science* *331*, 1315–1319.

Fortier, M., Celton-Morizur, S., and Desdouets, C. (2017). Incomplete cytokinesis/binucleation in mammals. In *Methods in Cell Biology*, (Elsevier), pp. 119–142.

Foti, D., Chiefari, E., Fedele, M., Iuliano, R., Brunetti, L., Paonessa, F., Manfioletti, G., Barbetti, F., Brunetti, A., Croce, C.M., et al. (2005). Lack of the architectural factor HMGA1 causes insulin resistance and diabetes in humans and mice. *Nat. Med.* *11*, 765–773.

Furuyama, K., Kawaguchi, Y., Akiyama, H., Horiguchi, M., Kodama, S., Kuhara, T., Hosokawa, S., Elbahrawy, A., Soeda, T., Koizumi, M., et al. (2011). Continuous cell supply from a Sox9-expressing progenitor zone in adult liver, exocrine pancreas and intestine. *Nat. Genet.* *43*, 34–41.

Gaillard, C., and Strauss, F. (2000). High affinity binding of proteins HMG1 and HMG2 to semicatenated DNA loops. *BMC Mol. Biol.*

Gan, L.T., Van Rooyen, D.M., Koina, M.E., McCuskey, R.S., Teoh, N.C., and Farrell, G.C. (2014). Hepatocyte free cholesterol lipotoxicity results from JNK1-mediated mitochondrial injury and is HMGB1 and TLR4-dependent. *J. Hepatol.* *61*, 1376–1384.

Gao, J.-J., Shi, Z.-Y., Xia, J.-F., Inagaki, Y., and Tang, W. (2015). Sorafenib-based combined molecule targeting in treatment of hepatocellular carcinoma. *World J. Gastroenterol.* *21*, 12059–12070.

Gardella, S., Andrei, C., Ferrera, D., Lotti, L.V., Torrisi, M.R., Bianchi, M.E., and Rubartelli, A. (2002). The nuclear protein HMGB1 is secreted by monocytes via a non-classical, vesicle-mediated secretory pathway. *EMBO Rep.* *3*, 995–1001.

Ge, H., and Roeder, R.G. (1994). The high mobility group protein HMG1 can reversibly inhibit class II gene transcription by interaction with the TATA-binding protein. *J. Biol. Chem.* *269*, 17136–17140.

Geerts, A. (2001). History, Heterogeneity, Developmental Biology, and Functions of Quiescent Hepatic Stellate Cells. *Semin. Liver Dis.* *21*, 311–336.

Geisler, C.E., and Renquist, B.J. (2017). Hepatic lipid accumulation: cause and consequence of dysregulated glucoendocrine hormones. *J. Endocrinol.* *234*, R1–R21.

Gelman, L., Zhou, G., Fajas, L., Raspé, E., Fruchart, J.-C., and Auwerx, J. (1999). p300 Interacts with the N- and C-terminal Part of PPAR γ 2 in a Ligand-independent and -dependent Manner, Respectively. *J. Biol. Chem.* *274*, 7681–7688.

Giavara, S., Kosmidou, E., Hande, M.P., Bianchi, M.E., Morgan, A., d'Adda di Fagagna, F., and Jackson, S.P. (2005). Yeast Nhp6A/B and Mammalian Hmgb1 Facilitate the Maintenance of Genome Stability. *Curr. Biol.* *15*, 68–72.

Girón, M.D., Vargas, A.M., Suárez, M.D., and Salto, R. (1998). Sequencing of Two Alternatively Spliced mRNAs Corresponding to the Extracellular Domain of the Rat Receptor for Advanced Glycosylation End Products (RAGE). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *251*, 230–234.

Gomez Perdiguero, E., Klapproth, K., Schulz, C., Busch, K., Azzoni, E., Crozet, L., Garner, H., Trouillet, C., de Bruijn, M.F., Geissmann, F., et al. (2015). Tissue-resident macrophages originate from yolk-sac-derived erythro-myeloid progenitors. *Nature* *518*, 547–551.

Gong, J., Sun, Z., Wu, L., Xu, W., Schieber, N., Xu, D., Shui, G., Yang, H., Parton, R.G., and Li, P. (2011). Fsp27 promotes lipid droplet growth by lipid exchange and transfer at lipid droplet contact sites. *J. Cell Biol.* *195*, 953–963.

Goodwin, G.H., Sanders, C., and Johns, E.W. (1973). A New Group of Chromatin-Associated Proteins with a High Content of Acidic and Basic Amino Acids. *Eur. J. Biochem.* *38*, 14–19.

Guo, D., Cao, C., Zhang, X., Xiang, L., and Shao, J. (2016). Scavenger Receptor SCARA5 Acts as an HMGB1 Recognition Molecule Negatively Involved in HMGB1-Mediated Inflammation in Fish Models. *J. Immunol.* *197*, 3198–3213.

Guzmán-Ruiz, R., Ortega, F., Rodríguez, A., Vázquez-Martínez, R., Díaz-Ruiz, A., Garcia-Navarro, S., Giralt, M., Garcia-Rios, A., Cobo-Padilla, D., Tinahones, F.J., et al. (2014). Alarmin high-mobility group B1 (HMGB1) is regulated in human adipocytes in insulin resistance and influences insulin secretion in β -cells. *Int. J. Obes.* *38*, 1545–1554.

Ha, J., and Kim, K.H. (1994). Inhibition of fatty acid synthesis by expression of an acetyl-CoA carboxylase-specific ribozyme gene. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *91*, 9951–9955.

Ha, J., Daniel, S., Broyles, S.S., and Kim, K.H. (1994). Critical phosphorylation sites for acetyl-CoA carboxylase activity. *J. Biol. Chem.* *269*, 22162–22168.

HA, J., LEE, J.-K., KIM, K.-S., WITTERSt, L.A., and KIM, K.-H. (1996). Cloning of human acetyl-CoA carboxylase-b and its unique features. *Proc Natl Acad Sci USA* *5*.

Hanf, R., Millatt, L.J., Cariou, B., Noel, B., Rigou, G., Delataille, P., Daix, V., Hum, D.W., and Staels, B. (2014). The dual peroxisome proliferator-activated receptor alpha/delta agonist GFT505 exerts anti-diabetic effects in db/db mice without peroxisome proliferator-activated receptor gamma-associated adverse cardiac effects. *Diab. Vasc. Dis. Res.* *11*, 440–447.

Hashimoto, D., Chow, A., Noizat, C., Teo, P., Beasley, M.B., Leboeuf, M., Becker, C.D., See, P., Price, J., Lucas, D., et al. (2013). Tissue-Resident Macrophages Self-Maintain Locally throughout Adult Life with Minimal Contribution from Circulating Monocytes. *Immunity* *38*, 792–804.

Heery, D.M., Kalkhoven, E., Hoare, S., and Parker, M.G. (1997). A signature motif in transcriptional co-activators mediates binding to nuclear receptors. *Nature* *387*, 733–736.

Heinlein, C.A., Ting, H.-J., Yeh, S., and Chang, C. (1999). Identification of ARA70 as a Ligand-enhanced Coactivator for the Peroxisome Proliferator-activated Receptor gamma. *J. Biol. Chem.* *274*, 16147–16152.

Heinzel, T., Lavinsky, R.M., Mullen, T.-M., Söderström, M., Laherty, C.D., Torchia, J., Yang, W.-M., Brard, G., Ngo, S.D., Davie, J.R., et al. (1997). A complex containing N-CoR, mSin3 and histone deacetylase mediates transcriptional repression. *Nature* *387*, 43.

Hemmi, H., Takeuchi, O., Kawai, T., Kaisho, T., Sato, S., Sanjo, H., Matsumoto, M., Hoshino, K., Wagner, H., Takeda, K., et al. (2000). A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* *408*, 740–745.

Herman, M.A., Peroni, O.D., Villoria, J., Schön, M.R., Abumrad, N.A., Blüher, M., Klein, S., and Kahn, B.B. (2012). A novel ChREBP isoform in adipose tissue regulates systemic glucose metabolism. *Nature* *484*, 333–338.

Hernández, E.Á., Kahl, S., Seelig, A., Begovatz, P., Irmeler, M., Kupriyanova, Y., Nowotny, B., Nowotny, P., Herder, C., Barosa, C., et al. (2017). Acute dietary fat intake initiates alterations in energy metabolism and insulin resistance. *J. Clin. Invest.*

Herrera, J.E., Sakaguchi, K., Bergel, M., Trieschmann, L., Nakatani, Y., and Bustin, M. (1999). Specific Acetylation of Chromosomal Protein HMG-17 by PCAF Alters Its Interaction with Nucleosomes. *Mol. Cell. Biol.* *19*, 3466–3473.

Herzig, S., Long, F., Jhala, U.S., Hedrick, S., Quinn, R., Bauer, A., Rudolph, D., Schutz, G., Yoon, C., Puigserver, P., et al. (2001). CREB regulates hepatic gluconeogenesis through the coactivator PGC-1. *Nature* *413*, 179–183.

Hoehme, S., Brulport, M., Bauer, A., Bedawy, E., Schormann, W., Hermes, M., Puppe, V., Gebhardt, R., Zellmer, S., Schwarz, M., et al. (2010). Prediction and validation of cell alignment along microvessels as order principle to restore tissue architecture in liver regeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *107*, 10371–10376.

Hofmann, M.A., Drury, S., Fu, C., Qu, W., Taguchi, A., Lu, Y., Avila, C., Kambham, N., Bierhaus, A., Nawroth, P., et al. (1999). RAGE Mediates a Novel Proinflammatory Axis: A Central Cell Surface Receptor for S100/Calgranulin Polypeptides. *Cell* *97*, 889–901.

Hoppe, G., Talcott, K.E., Bhattacharya, S.K., Crabb, J.W., and Sears, J.E. (2006). Molecular basis for the redox control of nuclear transport of the structural chromatin protein Hmgbl. *Exp. Cell Res.* *312*, 3526–3538.

Hori, O., Brett, J., Slattery, T., Cao, R., Zhang, J., Chen, J.X., Nagashima, M., Lundh, E.R., Vijay, S., Nitecki, D., et al. (1995). The Receptor for Advanced Glycation End Products (RAGE) Is a Cellular Binding Site for Amphotericin: MEDIATION OF NEURITE OUTGROWTH AND CO-EXPRESSION OF RAGE AND AMPHOTERICIN IN THE DEVELOPING NERVOUS SYSTEM. *J. Biol. Chem.* *270*, 25752–25761.

Hreggvidsdottir, H.S., Östberg, T., Wähämaa, H., Schierbeck, H., Aveberger, A.-C., Klevenvall, L., Palmblad, K., Ottosson, L., Andersson, U., and Harris, H.E. (2009). The alarmin HMGB1 acts in synergy with endogenous and exogenous danger signals to promote inflammation. *J. Leukoc. Biol.* *86*, 655–662.

Huang, B.Q., Masyuk, T.V., Muff, M.A., Tietz, P.S., Masyuk, A.I., and LaRusso, N.F. (2006). Isolation and characterization of cholangiocyte primary cilia. *Am. J. Physiol.-Gastrointest. Liver Physiol.* *291*, G500–G509.

Huang, H., Nace, G.W., McDonald, K.-A., Tai, S., Klune, J.R., Rosborough, B.R., Ding, Q., Loughran, P., Zhu, X., Beer-Stolz, D., et al. (2014). Hepatocyte-specific high-mobility group box 1 deletion worsens the injury in liver ischemia/reperfusion: A role for intracellular high-mobility group box 1 in cellular protection. *Hepatology* *59*, 1984–1997.

Huebener, P., Gwak, G.-Y., Pradere, J.-P., Quinzii, C.M., Friedman, R., Lin, C.-S., Trent, C.M., Mederacke, I., Zhao, E., Dapito, D.H., et al. (2014). High-Mobility Group Box 1 Is Dispensable for Autophagy, Mitochondrial Quality Control, and Organ Function In Vivo. *Cell Metab.* *19*, 539–547.

Huebener, P., Gwak, G.Y., and Schwabe, R.F. (2015). Comment on: HMGB1-dependent and -independent autophagy. *Autophagy* *11*, 1187–1188.

Huo, Y., Guo, X., Li, H., Xu, H., Halim, V., Zhang, W., Wang, H., Fan, Y.-Y., Ong, K.T., Woo, S.-L., et al. (2012). Targeted Overexpression of Inducible 6-Phosphofructo-2-kinase in Adipose Tissue Increases Fat Deposition but Protects against Diet-induced Insulin Resistance and Inflammatory Responses. *J. Biol. Chem.* *287*, 21492–21500.

Huttunen, H.J., Fages, C., and Rauvala, H. (1999). Receptor for Advanced Glycation End Products (RAGE)-mediated Neurite Outgrowth and Activation of NF- κ B Require the Cytoplasmic Domain of the Receptor but Different Downstream Signaling Pathways. *J. Biol. Chem.* *274*, 19919–19924.

Iacovoni, J.S., Caron, P., Lassadi, I., Nicolas, E., Massip, L., Trouche, D., and Legube, G. (2010). High-resolution profiling of γ H2AX around DNA double strand breaks in the mammalian genome. *EMBO J.* *29*, 1446–1457.

Inagaki, T., Choi, M., Moschetta, A., Peng, L., Cummins, C.L., McDonald, J.G., Luo, G., Jones, S.A., Goodwin, B., Richardson, J.A., et al. (2005). Fibroblast growth factor 15 functions as an enterohepatic signal to regulate bile acid homeostasis. *Cell Metab.* *2*, 217–225.

Inagaki, T., Dutchak, P., Zhao, G., Ding, X., Gautron, L., Parameswara, V., Li, Y., Goetz, R., Mohammadi, M., Esser, V., et al. (2007). Endocrine Regulation of the Fasting Response by PPAR α -Mediated Induction of Fibroblast Growth Factor 21. *Cell Metab.* 5, 415–425.

Inoue, M., Ohtake, T., Motomura, W., Takahashi, N., Hosoki, Y., Miyoshi, S., Suzuki, Y., Saito, H., Kohgo, Y., and Okumura, T. (2005). Increased expression of PPAR γ in high fat diet-induced liver steatosis in mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 336, 215–222.

Ishii, M., Vroman, B., and LaRusso, N.F. (1989). Isolation and morphologic characterization of bile duct epithelial cells from normal rat liver. *Gastroenterology* 97, 1236–1247.

Ito, I., Fukazawa, J., and Yoshida, M. (2007). Post-translational Methylation of High Mobility Group Box 1 (HMGB1) Causes Its Cytoplasmic Localization in Neutrophils. *J. Biol. Chem.* 282, 16336–16344.

Itoh, T., Fairall, L., Amin, K., Inaba, Y., Szanto, A., Balint, B.L., Nagy, L., Yamamoto, K., and Schwabe, J.W.R. (2008). Structural basis for the activation of PPAR γ by oxidized fatty acids. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 15, 924–931.

Ivanov, S., Dragoi, A.-M., Wang, X., Dallacosta, C., Louten, J., Musco, G., Sitia, G., Yap, G.S., Wan, Y., Biron, C.A., et al. (2007). A novel role for HMGB1 in TLR9-mediated inflammatory responses to CpG-DNA. *Blood* 110, 1970–1981.

Ix, J.H., Shlipak, M.G., Brandenburg, V.M., Ali, S., Ketteler, M., and Whooley, M.A. (2006). Association Between Human Fetuin-A and the Metabolic Syndrome Data From the Heart and Soul Study. *Circulation* 113, 1760–1767.

Iynedjian, P.B., Jotterand, D., Nospikel, T., Asfari, M., and Pilot, P.R. (1989). Transcriptional induction of glucokinase gene by insulin in cultured liver cells and its repression by the glucagon-cAMP system. *J. Biol. Chem.* 264, 21824–21829.

Jiang, W., Wang, S., Xiao, M., Lin, Y., Zhou, L., Lei, Q., Xiong, Y., Guan, K.-L., and Zhao, S. (2011). Acetylation regulates gluconeogenesis by promoting PEPCK1 degradation via recruiting the UBR5 ubiquitin ligase. *Mol. Cell* 43, 33–44.

Johnson, K.R., Lehn, D.A., and Reeves, R. (1989). Alternative processing of mRNAs encoding mammalian chromosomal high-mobility-group proteins HMG-I and HMG-Y. *Mol. Cell. Biol.* 9, 2114–2123.

- Jois, T., Chen, W., Howard, V., Harvey, R., Youngs, K., Thalmann, C., Saha, P., Chan, L., Cowley, M.A., and Sleeman, M.W. (2017). Deletion of hepatic carbohydrate response element binding protein (ChREBP) impairs glucose homeostasis and hepatic insulin sensitivity in mice. *Mol. Metab.* *6*, 1381–1394.
- Joshi, S.R., Sarpong, Y.C., Peterson, R.C., and Scovell, W.M. (2012). Nucleosome dynamics: HMGB1 relaxes canonical nucleosome structure to facilitate estrogen receptor binding. *Nucleic Acids Res.* *40*, 10161–10171.
- Jump, D.B. (2002). Dietary polyunsaturated fatty acid regulation of hepatic gene transcription. *Scand. J. Nutr.* *46*, 59–67.
- Kakisaka, K., Cazanave, S.C., Fingas, C.D., Guicciardi, M.E., Bronk, S.F., Werneburg, N.W., Mott, J.L., and Gores, G.J. (2011). Mechanisms of lysophosphatidylcholine-induced hepatocyte lipoapoptosis. *Am. J. Physiol.-Gastrointest. Liver Physiol.* *302*, G77–G84.
- Kalaany, N.Y., Gauthier, K.C., Zavacki, A.M., Mammen, P.P.A., Kitazume, T., Peterson, J.A., Horton, J.D., Garry, D.J., Bianco, A.C., and Mangelsdorf, D.J. (2005). LXRs regulate the balance between fat storage and oxidation. *Cell Metab.* *1*, 231–244.
- Kamagate, A., Qu, S., Perdomo, G., Su, D., Kim, D.H., Slusher, S., Meseck, M., and Dong, H.H. (2008). FoxO1 mediates insulin-dependent regulation of hepatic VLDL production in mice. *J. Clin. Invest.* *118*, 2347–2364.
- Kang, H.J., Lee, H., Choi, H.-J., Youn, J.H., Shin, J.-S., Ahn, Y.H., Yoo, J.S., Paik, Y.-K., and Kim, H. (2009). Non-histone nuclear factor HMGB1 is phosphorylated and secreted in colon cancers. *Lab. Invest.* *89*, 948–959.
- Khan, M.S., Knowles, B.B., Aden, D.P., and Rosne, R. (1981). SECRETION OF TESTOSTERONE-ESTRADIOL-BINDING GLOBULIN BY A HUMAN HEPATOMA-DERIVED CELL LINE. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *53*, 448–449.
- Kharitonov, A., Shiyanova, T.L., Koester, A., Ford, A.M., Micanovic, R., Galbreath, E.J., Sandusky, G.E., Hammond, L.J., Moyers, J.S., Owens, R.A., et al. (2005). FGF-21 as a novel metabolic regulator. *J. Clin. Invest.* *115*, 1627–1635.

Kim, K., Boo, K., Yu, Y.S., Oh, S.K., Kim, H., Jeon, Y., Bhin, J., Hwang, D., Kim, K.I., Lee, J.-S., et al. (2017). ROR α controls hepatic lipid homeostasis via negative regulation of PPAR γ transcriptional network. *Nat. Commun.* *8*.

Kim, Y.H., Kwak, M.S., Park, J.B., Lee, S.-A., Choi, J.E., Cho, H.-S., and Shin, J.-S. (2016a). N-linked glycosylation plays a crucial role in the secretion of HMGB1. *J. Cell Sci.* *129*, 29–38.

Kim, Y.H., Kwak, M.S., Shin, J.M., Hayuningtyas, R.A., Choi, J.E., and Shin, J.-S. (2018). Inflachromene inhibits autophagy through modulation of Beclin 1 activity. *J Cell Sci* *131*, jcs211201.

Kim, Y.M., Park, E.J., Kim, J.H., Park, S.W., Kim, H.J., and Chang, K.C. (2016b). Ethyl pyruvate inhibits the acetylation and release of HMGB1 via effects on SIRT1/STAT signaling in LPS-activated RAW264.7 cells and peritoneal macrophages. *Int. Immunopharmacol.* *41*, 98–105.

Kirchgesner, T.G., Sleph, P., Ostrowski, J., Lupisella, J., Ryan, C.S., Liu, X., Fernando, G., Grimm, D., Shipkova, P., Zhang, R., et al. (2016). Beneficial and Adverse Effects of an LXR Agonist on Human Lipid and Lipoprotein Metabolism and Circulating Neutrophils. *Cell Metab.* *24*, 223–233.

Kleiner, D.E., Brunt, E.M., Natta, M.V., Behling, C., Contos, M.J., Cummings, O.W., Ferrell, L.D., Liu, Y.-C., Torbenson, M.S., Unalp-Arida, A., et al. (2005). Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* *41*, 1313–1321.

Kokkola, R., Sundberg, E., Ulfgren, A.-K., Palmblad, K., Li, J., Wang, H., Ulloa, L., Yang, H., Yan, X.-J., Furie, R., et al. (2002). High mobility group box chromosomal protein 1: A novel proinflammatory mediator in synovitis. *Arthritis Rheum.* *46*, 2598–2603.

Kokkola, R., Li, J., Sundberg, E., Aveberger, A.-C., Palmblad, K., Yang, H., Tracey, K.J., Andersson, U., and Harris, H.E. (2003). Successful treatment of collagen-induced arthritis in mice and rats by targeting extracellular high mobility group box chromosomal protein 1 activity. *Arthritis Rheum.* *48*, 2052–2058.

Kokkola, R., Andersson, Å., Mullins, G., Östberg, T., Treutiger, C.-J., Arnold, B., Nawroth, P., Andersson, U., Harris, R.A., and Harris, H.E. (2005). RAGE is the Major Receptor for the Proinflammatory Activity of HMGB1 in Rodent Macrophages. *Scand. J. Immunol.* *61*, 1–9.

Koliaki, C., Szendroedi, J., Kaul, K., Jelenik, T., Nowotny, P., Jankowiak, F., Herder, C., Carstensen, M., Krausch, M., Knoefel, W.T., et al. (2015). Adaptation of Hepatic Mitochondrial Function in Humans with Non-Alcoholic Fatty Liver Is Lost in Steatohepatitis. *Cell Metab.* *21*, 739–746.

- Komai, K., Shichita, T., Ito, M., Kanamori, M., Chikuma, S., and Yoshimura, A. (2017). Role of scavenger receptors as damage-associated molecular pattern receptors in Toll-like receptor activation. *Int. Immunol.* *29*, 59–70.
- Kordes, C., Sawitza, I., Götze, S., Herebian, D., and Häussinger, D. (2014). Hepatic stellate cells contribute to progenitor cells and liver regeneration. *J. Clin. Invest.* *124*, 5503–5515.
- Korenblat, K.M., Fabbrini, E., Mohammed, B.S., and Klein, S. (2008). Liver, Muscle and Adipose Tissue Insulin Action is Directly Related to Intrahepatic Triglyceride Content in Obese Subjects. *Gastroenterology* *134*, 1369–1375.
- Kotronen, A., Johansson, L.E., Johansson, L.M., Roos, C., Westerbacka, J., Hamsten, A., Bergholm, R., Arkkila, P., Arola, J., Kiviluoto, T., et al. (2009). A common variant in PNPLA3, which encodes adiponutrin, is associated with liver fat content in humans. *Diabetologia* *52*, 1056–1060.
- Kovacs, P., Harper, I., Hanson, R.L., Infante, A.M., Bogardus, C., Tataranni, P.A., and Baier, L.J. (2004). A Novel Missense Substitution (Val1483Ile) in the Fatty Acid Synthase Gene (FAS) Is Associated With Percentage of Body Fat and Substrate Oxidation Rates in Nondiabetic Pima Indians. *Diabetes* *53*, 1915–1919.
- Kugler, J.E., Horsch, M., Huang, D., Furusawa, T., Rochman, M., Garrett, L., Becker, L., Bohla, A., Hölter, S.M., Prehn, C., et al. (2013). High Mobility Group N Proteins Modulate the Fidelity of the Cellular Transcriptional Profile in a Tissue- and Variant-specific Manner. *J. Biol. Chem.* *288*, 16690–16703.
- Lander, H.M., Tauras, J.M., Ogiste, J.S., Hori, O., Moss, R.A., and Schmidt, A.M. (1997). Activation of the Receptor for Advanced Glycation End Products Triggers a p21 ras -dependent Mitogen-activated Protein Kinase Pathway Regulated by Oxidant Stress. *J. Biol. Chem.* *272*, 17810–17814.
- Lange, S.S., and Vasquez, K.M. (2009). HMGB1: The jack-of-all-trades protein is a master DNA repair mechanic. *Mol. Carcinog.* *48*, 571–580.
- Langlet, F., Haeusler, R.A., Lindén, D., Ericson, E., Norris, T., Johansson, A., Cook, J.R., Aizawa, K., Wang, L., Buettner, C., et al. (2017). Selective Inhibition of FOXO1 Activator/Repressor Balance Modulates Hepatic Glucose Handling. *Cell*.
- Latasa, M.-J., Griffin, M.J., Moon, Y.S., Kang, C., and Sul, H.S. (2003). Occupancy and Function of the –150 Sterol Regulatory Element and –65 E-Box in Nutritional Regulation of the Fatty Acid Synthase Gene in Living Animals. *Mol. Cell. Biol.* *23*, 5896–5907.

- Lau, J.K.C., Zhang, X., and Yu, J. (2017). Animal models of non-alcoholic fatty liver disease: current perspectives and recent advances. *J. Pathol.* *241*, 36–44.
- LeBlanc, P.M., Doggett, T.A., Choi, J., Hancock, M.A., Durocher, Y., Frank, F., Nagar, B., Ferguson, T.A., and Saleh, M. (2014). An Immunogenic Peptide in the A-box of HMGB1 Protein Reverses Apoptosis-induced Tolerance through RAGE Receptor. *J. Biol. Chem.* *289*, 7777–7786.
- Lee, C.-H., Olson, P., Hevener, A., Mehl, I., Chong, L.-W., Olefsky, J.M., Gonzalez, F.J., Ham, J., Kang, H., Peters, J.M., et al. (2006). PPAR δ regulates glucose metabolism and insulin sensitivity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *103*, 3444–3449.
- Lee, H., Park, M., Shin, N., Kim, G., Kim, Y.G., Shin, J.-S., and Kim, H. (2012). High mobility group box-1 is phosphorylated by protein kinase C zeta and secreted in colon cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *424*, 321–326.
- Lee, J., Choi, J., Scafidi, S., and Wolfgang, M.J. (2016). Hepatic Fatty Acid Oxidation Restrains Systemic Catabolism during Starvation. *Cell Rep.* *16*, 201–212.
- Lee, S., Nam, Y., Koo, J.Y., Lim, D., Park, J., Ock, J., Kim, J., Suk, K., and Park, S.B. (2014). A small molecule binding HMGB1 and HMGB2 inhibits microglia-mediated neuroinflammation. *Nat. Chem. Biol.* *10*, 1055–1060.
- Lee, S.-K., Jung, S.-Y., Kim, Y.-S., Na, S.-Y., Lee, Y.C., and Lee, J.W. (2001). Two Distinct Nuclear Receptor-Interaction Domains and CREB-Binding Protein-Dependent Transactivation Function of Activating Signal Cointegrator-2. *Mol. Endocrinol.* *15*, 241–254.
- Lee, W.M., Squires, R.H., Nyberg, S.L., Doo, E., and Hoofnagle, J.H. (2008). Acute liver failure: Summary of a workshop. *Hepatology* *47*, 1401–1415.
- Lee-Montiel, F.T., George, S.M., Gough, A.H., Sharma, A.D., Wu, J., DeBiasio, R., Verneti, L.A., and Taylor, D.L. (2017). Control of oxygen tension recapitulates zone-specific functions in human liver microphysiology systems. *Exp. Biol. Med.* *242*, 1617–1632.
- Leung, N.W.Y., Farrant, P., and Peters, T.J. (1986). Liver volume measurement by ultrasonography in normal subjects and alcoholic patients. *J. Hepatol.* *2*, 157–164.

- Li, J., Kokkola, R., Tabibzadeh, S., Yang, R., Ochani, M., Qiang, X., Harris, H.E., Czura, C.J., Wang, H., Ulloa, L., et al. (2003). Structural Basis for the Proinflammatory Cytokine Activity of High Mobility Group Box 1. *Mol. Med.* *9*, 37–45.
- Li, J.Z., Huang, Y., Karaman, R., Ivanova, P.T., Brown, H.A., Roddy, T., Castro-Perez, J., Cohen, J.C., and Hobbs, H.H. (2012). Chronic overexpression of PNPLA3I148M in mouse liver causes hepatic steatosis. *J. Clin. Invest.* *122*, 4130–4144.
- Li, M.V., Chang, B., Imamura, M., Pongvarin, N., and Chan, L. (2006). Glucose-Dependent Transcriptional Regulation by an Evolutionarily Conserved Glucose-Sensing Module. *Diabetes* *55*, 1179–1189.
- Li, Z.Z., Berk, M., McIntyre, T.M., and Feldstein, A.E. (2009). Hepatic Lipid Partitioning and Liver Damage in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *J. Biol. Chem.* *284*, 5637–5644.
- Lim, J.-H., Catez, F., Birger, Y., West, K.L., Prymakowska-Bosak, M., Postnikov, Y.V., and Bustin, M. (2004). Chromosomal Protein HMGN1 Modulates Histone H3 Phosphorylation. *Mol. Cell* *15*, 573–584.
- Listenberger, L.L., Han, X., Lewis, S.E., Cases, S., Farese, R.V., Ory, D.S., and Schaffer, J.E. (2003). Triglyceride accumulation protects against fatty acid-induced lipotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 3077–3082.
- Little, A.J., Corbett, E., Ortega, F., and Schatz, D.G. (2013). Cooperative recruitment of HMGB1 during V(D)J recombination through interactions with RAG1 and DNA. *Nucleic Acids Res.* *41*, 3289–3301.
- Liu, S., Hatano, B., Zhao, M., Yen, C.-C., Kang, K., Reilly, S.M., Gangl, M.R., Gorgun, C., Balschi, J.A., Ntambi, J.M., et al. (2011). Role of Peroxisome Proliferator-activated Receptor δ/β in Hepatic Metabolic Regulation. *J. Biol. Chem.* *286*, 1237–1247.
- Livesey, K.M., Kang, R., Vernon, P., Buchser, W., Loughran, P., Watkins, S.C., Zhang, L., Manfredi, J.J., Zeh, H.J., Li, L., et al. (2012). p53/HMGB1 Complexes Regulate Autophagy and Apoptosis. *Cancer Res.* *72*, 1996–2005.
- Louie, D.R., Gloor, K.K., Galasinski, S.C., Resing, K.A., and Ahn, N.G. (2008). Phosphorylation and subcellular redistribution of high mobility group proteins 14 and 17, analyzed by mass spectrometry. *Protein Sci.* *9*, 170–179.

Lu, B., Antoine, D.J., Kwan, K., Lundback, P., Wahamaa, H., Schierbeck, H., Robinson, M., Van Zoelen, M.A.D., Yang, H., Li, J., et al. (2014). JAK/STAT1 signaling promotes HMGB1 hyperacetylation and nuclear translocation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *111*, 3068–3073.

Lund, T., Holtlund, J., Fredriksen, M., and Laland, S.G. (1983). On the presence of two new high mobility group-like proteins in HeLa S3 cells. *FEBS Lett.* *152*, 163–167.

Lundbäck, P., Lea, J.D., Sowinska, A., Ottosson, L., Fürst, C.M., Steen, J., Aulin, C., Clarke, J.I., Kipar, A., Klevenvall, L., et al. (2016). A novel high mobility group box 1 neutralizing chimeric antibody attenuates drug-induced liver injury and postinjury inflammation in mice: Lundbäck et al. *Hepatology*.

MacDonald, R.A. (1961). “lifespan” of liver cells: Autoradiographic study using tritiated thymidine in normal, cirrhotic, and partially hepatectomized rats. *Arch. Intern. Med.* *107*, 335–343.

Malato, Y., Naqvi, S., Schürmann, N., Ng, R., Wang, B., Zape, J., Kay, M.A., Grimm, D., and Willenbring, H. (2011). Fate tracing of mature hepatocytes in mouse liver homeostasis and regeneration. *J. Clin. Invest.* *121*, 4850–4860.

Mao, J., Chirala, S.S., and Wakil, S.J. (2003). Human acetyl-CoA carboxylase 1 gene: Presence of three promoters and heterogeneity at the 5'-untranslated mRNA region. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *100*, 7515–7520.

Mao, J., DeMayo, F.J., Li, H., Abu-Elheiga, L., Gu, Z., Shaikenov, T.E., Kordari, P., Chirala, S.S., Heird, W.C., and Wakil, S.J. (2006). Liver-specific deletion of acetyl-CoA carboxylase 1 reduces hepatic triglyceride accumulation without affecting glucose homeostasis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *103*, 8552–8557.

Marchesini, G., Brizi, M., Bianchi, G., Tomassetti, S., Bugianesi, E., Lenzi, M., McCullough, A.J., Natale, S., Forlani, G., and Melchionda, N. (2001). Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Feature of the Metabolic Syndrome. *Diabetes* *50*, 1844–1850.

Mardian, J., Paton, A., Bunick, G., and Olins, D. (1980). Nucleosome cores have two specific binding sites for nonhistone chromosomal proteins HMG 14 and HMG 17. *Science* *209*, 1534–1536.

Marí, M., Caballero, F., Colell, A., Morales, A., Caballeria, J., Fernandez, A., Enrich, C., Fernandez-Checa, J.C., and García-Ruiz, C. (2006). Mitochondrial free cholesterol loading sensitizes to TNF- and Fas-mediated steatohepatitis. *Cell Metab.* *4*, 185–198.

Mathews, S.T., Singh, G.P., Ranalletta, M., Cintron, V.J., Qiang, X., Goustin, A.S., Jen, K.-L.C., Charron, M.J., Jahnen-Dechent, W., and Grunberger, G. (2002). Improved Insulin Sensitivity and Resistance to Weight Gain in Mice Null for the Ahsg Gene. *Diabetes* 51, 2450–2458.

Matsusue, K., Haluzik, M., Lambert, G., Yim, S.-H., Gavrilova, O., Ward, J.M., Brewer, B., Reitman, M.L., and Gonzalez, F.J. (2003). Liver-specific disruption of PPAR γ in leptin-deficient mice improves fatty liver but aggravates diabetic phenotypes. *J. Clin. Invest.* 111, 737–747.

Matsuzaka, T., Shimano, H., Yahagi, N., Kato, T., Atsumi, A., Yamamoto, T., Inoue, N., Ishikawa, M., Okada, S., Ishigaki, N., et al. (2007). Crucial role of a long-chain fatty acid elongase, Elovl6, in obesity-induced insulin resistance. *Nat. Med.* 13, 1193–1202.

Matthews, K.S. (1992). DNA looping. *Microbiol. Rev.* 56, 123–136.

McKinney, K., and Prives, C. (2002). Efficient Specific DNA Binding by p53 Requires both Its Central and C-Terminal Domains as Revealed by Studies with High-Mobility Group 1 Protein. *Mol. Cell. Biol.* 22, 6797–6808.

Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., and Janeway, C.A. (1997). A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 388, 394–397.

Merenmies, J., Pihlaskari, R., Laitinen, J., Wartiovaara, J., and Rauvala, H. (1991). 30-kDa heparin-binding protein of brain (amphoterin) involved in neurite outgrowth. Amino acid sequence and localization in the filopodia of the advancing plasma membrane. *J. Biol. Chem.* 266, 16722–16729.

Merimee, T.J., Zapf, J., and Froesch, E.R. (1981). Dwarfism in the Pygmy. *N. Engl. J. Med.* 305, 965–968.

Michalopoulos, G.K. (2010). Liver Regeneration after Partial Hepatectomy. *Am. J. Pathol.* 176, 2–13.

Min, H.-K., Kapoor, A., Fuchs, M., Mirshahi, F., Zhou, H., Maher, J., Kellum, J., Warnick, R., Contos, M.J., and Sanyal, A.J. (2012). Increased Hepatic Synthesis and Dysregulation of Cholesterol Metabolism Is Associated with the Severity of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Cell Metab.* 15, 665–674.

Misu, H., Takamura, T., Takayama, H., Hayashi, H., Matsuzawa-Nagata, N., Kurita, S., Ishikura, K., Ando, H., Takeshita, Y., Ota, T., et al. (2010). A Liver-Derived Secretory Protein, Selenoprotein P, Causes Insulin Resistance. *Cell Metab.* 12, 483–495.

Mittendorfer, B., Yoshino, M., Patterson, B.W., and Klein, S. (2016). VLDL Triglyceride Kinetics in Lean, Overweight, and Obese Men and Women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 101, 4151–4160.

Miyata, K.S., McCaw, S.E., Meertens, L.M., Patel, H.V., Rachubinski, R.A., and Capone, J.P. (1998). Receptor-interacting protein 140 interacts with and inhibits transactivation by, peroxisome proliferator-activated receptor α and liver-X-receptor β . *Mol. Cell. Endocrinol.* **8**.

Moessinger, C., Kuerschner, L., Spandl, J., Shevchenko, A., and Thiele, C. (2011). Human Lysophosphatidylcholine Acyltransferases 1 and 2 Are Located in Lipid Droplets Where They Catalyze the Formation of Phosphatidylcholine. *J. Biol. Chem.* **286**, 21330–21339.

Moller, D.E., and Kaufman, K.D. (2005). Metabolic Syndrome: A Clinical and Molecular Perspective. *Annu. Rev. Med.* **56**, 45–62.

Mollica, L., De Marchis, F., Spitaleri, A., Dallacosta, C., Pennacchini, D., Zamai, M., Agresti, A., Trisciuglio, L., Musco, G., and Bianchi, M.E. (2007). Glycyrrhizin Binds to High-Mobility Group Box 1 Protein and Inhibits Its Cytokine Activities. *Chem. Biol.* **14**, 431–441.

Monetti, M., Levin, M.C., Watt, M.J., Sajan, M.P., Marmor, S., Hubbard, B.K., Stevens, R.D., Bain, J.R., Newgard, C.B., Farese, R.V., et al. (2007). Dissociation of Hepatic Steatosis and Insulin Resistance in Mice Overexpressing DGAT in the Liver. *Cell Metab.* **6**, 69–78.

Moon, Y.-A., Shah, N.A., Mohapatra, S., Warrington, J.A., and Horton, J.D. (2001). Identification of a Mammalian Long Chain Fatty Acyl Elongase Regulated by Sterol Regulatory Element-binding Proteins. *J. Biol. Chem.* **276**, 45358–45366.

Moon, Y.-A., Liang, G., Xie, X., Frank-Kamenetsky, M., Fitzgerald, K., Koteliansky, V., Brown, M.S., Goldstein, J.L., and Horton, J.D. (2012). The Scap/SREBP Pathway Is Essential for Developing Diabetic Fatty Liver and Carbohydrate-Induced Hypertriglyceridemia in Animals. *Cell Metab.* **15**, 240–246.

Moran-Salvador, E., Lopez-Parra, M., Garcia-Alonso, V., Titos, E., Martinez-Clemente, M., Gonzalez-Periz, A., Lopez-Vicario, C., Barak, Y., Arroyo, V., and Claria, J. (2011). Role for PPAR in obesity-induced hepatic steatosis as determined by hepatocyte- and macrophage-specific conditional knockouts. *FASEB J.* **25**, 2538–2550.

Moses, A.C., Young, S.C.J., Morrow, L.A., O'Brien, M., and Clemmons, D.R. (1996). Recombinant Human Insulin-like Growth Factor I Increases Insulin Sensitivity and Improves Glycemic Control in Type II Diabetes. *Diabetes.* **45**, 10.

Mudaliar, S., Henry, R.R., Sanyal, A.J., Morrow, L., Marschall, H., Kipnes, M., Adorini, L., Sciacca, C.I., Clopton, P., Castelloe, E., et al. (2013). Efficacy and Safety of the Farnesoid X Receptor Agonist

Obeticholic Acid in Patients With Type 2 Diabetes and Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology* 145, 574-582.e1.

Müller, S., Ronfani, L., and Bianchi, M.E. (2004). Regulated expression and subcellular localization of HMGB1, a chromatin protein with a cytokine function. *J. Intern. Med.* 255, 332–343.

Munshi, N. (2001). Coordination of a Transcriptional Switch by HMGI(Y) Acetylation. *Science* 293, 1133–1136.

Murphy, S.K., Yang, H., Moylan, C.A., Pang, H., Dellinger, A., Abdelmalek, M.F., Garrett, M.E., Ashley-Koch, A., Suzuki, A., Tillmann, H.L., et al. (2013). Relationship between methylome and transcriptome in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 145, 1076–1087.

Nagpal, S., Ghosn, C., DiSepio, D., Molina, Y., Sutter, M., Klein, E.S., and Chandraratna, R.A.S. (1999). Retinoid-dependent Recruitment of a Histone H1 Displacement Activity by Retinoic Acid Receptor. *J. Biol. Chem.* 274, 22563–22568.

Najima, Y., Yahagi, N., Takeuchi, Y., Matsuzaka, T., Sekiya, M., Nakagawa, Y., Amemiya-Kudo, M., Okazaki, H., Okazaki, S., Tamura, Y., et al. (2005). High mobility group protein-B1 interacts with sterol regulatory element-binding proteins to enhance their DNA binding. *J. Biol. Chem.* 280, 27523–27532.

Nativel, B., Marimoutou, M., Thon-Hon, V.G., Gunasekaran, M.K., Andries, J., Stanislas, G., Planesse, C., Da Silva, C.R., Césari, M., Iwema, T., et al. (2013). Soluble HMGB1 Is a Novel Adipokine Stimulating IL-6 Secretion through RAGE Receptor in SW872 Preadipocyte Cell Line: Contribution to Chronic Inflammation in Fat Tissue. *PLoS ONE* 8.

Neeper, M., Schmidt, A.M., Brett, J., Yan, S.D., Wang, F., Pan, Y.C., Elliston, K., Stern, D., and Shaw, A. (1992). Cloning and expression of a cell surface receptor for advanced glycosylation end products of proteins. *J. Biol. Chem.* 267, 14998–15004.

Nemeth, M.J. (2003). Hmgb3: an HMG-box family member expressed in primitive hematopoietic cells that inhibits myeloid and B-cell differentiation. *Blood* 102, 1298–1306.

Nguyen, P., Leray, V., Diez, M., Serisier, S., Bloc'h, J.L., Siliart, B., and Dumon, H. Liver lipid metabolism. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 92, 272–283.

Nishimura, T., Nakatake, Y., Konishi, M., and Itoh, N. (2000). Identification of a novel FGF, FGF-21, preferentially expressed in the liver. *Biochim. Biophys. Acta* 1492, 203–206.

- Nolte, R.T., Wisely, G.B., Westin, S., Cobb, J.E., Lambert, M.H., Kurokawa, R., Rosenfeld, M.G., Willson, T.M., Glass, C.K., and Milburn, M.V. (1998). Ligand binding and co-activator assembly of the peroxisome proliferator-activated receptor- γ . *Nature* 395, 137–143.
- Oh, S.-Y., Park, S.-K., Kim, J.-W., Ahn, Y.-H., Park, S.-W., and Kim, K.-S. (2003). Acetyl-CoA Carboxylase β Gene Is Regulated by Sterol Regulatory Element-binding Protein-1 in Liver. *J. Biol. Chem.* 278, 28410–28417.
- Oike, Y., Akao, M., Yasunaga, K., Yamauchi, T., Morisada, T., Ito, Y., Urano, T., Kimura, Y., Kubota, Y., Maekawa, H., et al. (2005). Angiopoietin-related growth factor antagonizes obesity and insulin resistance. *Nat. Med.* 11, 400–408.
- O’Neill, L.A.J., Golenbock, D., and Bowie, A.G. (2013). The history of Toll-like receptors — redefining innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 13, 453–460.
- Ostermeyer, A.G., Ramcharan, L.T., Zeng, Y., Lublin, D.M., and Brown, D.A. (2004). Role of the hydrophobic domain in targeting caveolin-1 to lipid droplets. *J. Cell Biol.* 164, 69–78.
- Paku, S., Schnur, J., Nagy, P., and Thorgeirsson, S.S. (2001). Origin and Structural Evolution of the Early Proliferating Oval Cells in Rat Liver. *Am. J. Pathol.* 158, 1313–1323.
- Panne, D. (2008). The enhanceosome. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 18, 236–242.
- Papazyan, R., Sun, Z., Kim, Y.H., Titchenell, P.M., Hill, D.A., Lu, W., Damle, M., Wan, M., Zhang, Y., Briggs, E.R., et al. (2016). Physiological Suppression of Lipotoxic Liver Damage by Complementary Actions of HDAC3 and SCAP/SREBP. *Cell Metab.* 24, 863–874.
- Park, J.S., Gamboni-Robertson, F., He, Q., Svetkauskaite, D., Kim, J.-Y., Strassheim, D., Sohn, J.-W., Yamada, S., Maruyama, I., Banerjee, A., et al. (2006). High mobility group box 1 protein interacts with multiple Toll-like receptors. *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.* 290, C917–C924.
- Passino, M.A., Adams, R.A., Sikorski, S.L., and Akassoglou, K. (2007). Regulation of Hepatic Stellate Cell Differentiation by the Neurotrophin Receptor p75NTR. *Science* 315, 1853–1856.
- Paton, C.M., and Ntambi, J.M. (2009). Biochemical and physiological function of stearoyl-CoA desaturase. *Am. J. Physiol.-Endocrinol. Metab.* 297, E28–E37.

Peet, D.J., Turley, S.D., Ma, W., Janowski, B.A., Lobaccaro, J.-M.A., Hammer, R.E., and Mangelsdorf, D.J. (1998). Cholesterol and Bile Acid Metabolism Are Impaired in Mice Lacking the Nuclear Oxysterol Receptor LXRA. *Cell* 93, 693–407.

Perry, J.R.B., Weedon, M.N., Langenberg, C., Jackson, A.U., Lyssenko, V., Sparsø, T., Thorleifsson, G., Grallert, H., Ferrucci, L., Maggio, M., et al. (2010). Genetic evidence that raised sex hormone binding globulin (SHBG) levels reduce the risk of type 2 diabetes. *Hum. Mol. Genet.* 19, 535–544.

Petersen, M.C., Madiraju, A.K., Gassaway, B.M., Marcel, M., Nasiri, A.R., Butrico, G., Marcucci, M.J., Zhang, D., Abulizi, A., Zhang, X.-M., et al. (2016). Insulin receptor Thr1160 phosphorylation mediates lipid-induced hepatic insulin resistance. *J. Clin. Invest.*

Pettinelli, P., and Videla, L.A. (2011). Up-Regulation of PPAR- γ mRNA Expression in the Liver of Obese Patients: an Additional Reinforcing Lipogenic Mechanism to SREBP-1c Induction. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 96, 1424–1430.

Pickles, S., Vigié, P., and Youle, R.J. (2018). Mitophagy and Quality Control Mechanisms in Mitochondrial Maintenance. *Curr. Biol.* 28, R170–R185.

Pierce, M.W., Palmer, J.L., Keutmann, H.T., and Avruch, J. (1981). ATP-citrate lyase. Structure of a tryptic peptide containing the phosphorylation site directed by glucagon and the cAMP-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* 256, 8867–8870.

Pirola, C.J., Gianotti, T.F., Burgueño, A.L., Rey-Funes, M., Loidl, C.F., Mallardi, P., Martino, J.S., Castaño, G.O., and Sookoian, S. (2013). Epigenetic modification of liver mitochondrial DNA is associated with histological severity of nonalcoholic fatty liver disease. *Gut* 62, 1356–1363.

Pogribny, I.P., Tryndyak, V.P., Bagnyukova, T.V., Melnyk, S., Montgomery, B., Ross, S.A., Latendresse, J.R., Rusyn, I., and Beland, F.A. (2009). Hepatic epigenetic phenotype predetermines individual susceptibility to hepatic steatosis in mice fed a lipogenic methyl-deficient diet. *J. Hepatol.* 51, 176–186.

Polanská, E., Dobšáková, Z., Dvořáčková, M., Fajkus, J., and Štros, M. (2012). HMGB1 gene knockout in mouse embryonic fibroblasts results in reduced telomerase activity and telomere dysfunction. *Chromosoma* 121, 419–431.

Poltorak, A. (1998). Defective LPS Signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr Mice: Mutations in Tlr4 Gene. *Science* 282, 2085–2088.

- Postic, C., Shiota, M., Niswender, K.D., Jetton, T.L., Chen, Y., Moates, J.M., Shelton, K.D., Lindner, J., Cherrington, A.D., and Magnuson, M.A. (1999). Dual Roles for Glucokinase in Glucose Homeostasis as Determined by Liver and Pancreatic β Cell-specific Gene Knock-outs Using Cre Recombinase. *J. Biol. Chem.* *274*, 305–315.
- Poungvarin, N., Chang, B., Imamura, M., Chen, J., Moolsuwan, K., Sae-Lee, C., Li, W., and Chan, L. (2015). Genome-Wide Analysis of ChREBP Binding Sites on Male Mouse Liver and White Adipose Chromatin. *Endocrinology* *156*, 1982–1994.
- Prymakowska-Bosak, M., Misteli, T., Herrera, J.E., Shirakawa, H., Birger, Y., Garfield, S., and Bustin, M. (2001). Mitotic Phosphorylation Prevents the Binding of HMGN Proteins to Chromatin. *Mol. Cell. Biol.* *21*, 5169–5178.
- Puigserver, P., Wu, Z., Park, C.W., Graves, R., Wright, M., and Spiegelman, B.M. (1998). A Cold-Inducible Coactivator of Nuclear Receptors Linked to Adaptive Thermogenesis. *Cell* *92*, 829–839.
- Puri, P., Baillie, R.A., Wiest, M.M., Mirshahi, F., Choudhury, J., Cheung, O., Sargeant, C., Contos, M.J., and Sanyal, A.J. (2007). A lipidomic analysis of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* *46*, 1081–1090.
- Qin, X., Xie, X., Fan, Y., Tian, J., Guan, Y., Wang, X., Zhu, Y., and Wang, N. (2008). Peroxisome proliferator-activated receptor- δ induces insulin-induced gene-1 and suppresses hepatic lipogenesis in obese diabetic mice. *Hepatology* *48*, 432–441.
- Qin, Y.-H., Dai, S.-M., Tang, G.-S., Zhang, J., Ren, D., Wang, Z.-W., and Shen, Q. (2009). HMGB1 Enhances the Proinflammatory Activity of Lipopolysaccharide by Promoting the Phosphorylation of MAPK p38 through Receptor for Advanced Glycation End Products. *J. Immunol.* *183*, 6244–6250.
- Rabadi, M.M., Xavier, S., Vasko, R., Kaur, K., Goligorsky, M.S., and Ratliff, B.B. (2015). High mobility group box 1 is a novel deacetylation target of Sirtuin1. *Kidney Int.* *87*, 95–108.
- Raben, N., Baum, R., Schreiner, C., Takikita, S., Mizushima, N., Ralston, E., and Plotz, P. (2009). When more is less. *Autophagy* *5*, 111–113.
- Rakhshandehroo, M., Hoiveld, G., Müller, M., and Kersten, S. (2009). Comparative Analysis of Gene Regulation by the Transcription Factor PPAR α between Mouse and Human. *PLoS ONE* *4*.

Ramachandran, P., and Iredale, J.P. (2012). Liver fibrosis: a bidirectional model of fibrogenesis and resolution. *QJM Int. J. Med.* *105*, 813–817.

Ratziu, V., Harrison, S.A., Francque, S., Bedossa, P., Lehert, P., Serfaty, L., Romero-Gomez, M., Boursier, J., Abdelmalek, M., Caldwell, S., et al. (2016). Elafibranor, an Agonist of the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- α and - δ , Induces Resolution of Nonalcoholic Steatohepatitis Without Fibrosis Worsening. *Gastroenterology* *150*, 1147-1159.e5.

Reddy, J.K., and Hashimoto, and T. (2001). PEROXISOMAL β -OXIDATION AND PEROXISOME PROLIFERATOR-ACTIVATED RECEPTOR α : An Adaptive Metabolic System. *Annu. Rev. Nutr.* *21*, 193–230.

Reeves, R., and Nissen, M.S. (1990). The A.T-DNA-binding domain of mammalian high mobility group I chromosomal proteins. A novel peptide motif for recognizing DNA structure. *J. Biol. Chem.* *265*, 8573–8582.

Reeves, R., Langan, T.A., and Nissen, M.S. (1991). Phosphorylation of the DNA-binding domain of nonhistone high-mobility group I protein by cdc2 kinase: reduction of binding affinity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *88*, 1671–1675.

Repa, J.J., Liang, G., Ou, J., Bashmakov, Y., Lobaccaro, J.-M.A., Shimomura, I., Shan, B., Brown, M.S., Goldstein, J.L., and Mangelsdorf, D.J. (2000). Regulation of mouse sterol regulatory element-binding protein-1c gene (SREBP-1c) by oxysterol receptors, LXR α and LXR β . *Genes Dev.* *14*, 2819–2830.

Repa, J.J., Berge, K.E., Pomajzl, C., Richardson, J.A., Hobbs, H., and Mangelsdorf, D.J. (2002). Regulation of ATP-binding Cassette Sterol Transporters ABCG5 and ABCG8 by the Liver X Receptors α and β . *J. Biol. Chem.* *277*, 18793–18800.

Rickenbacher, A., Jang, J.H., Limani, P., Ungethüm, U., Lehmann, K., Oberkofler, C.E., Weber, A., Graf, R., Humar, B., and Clavien, P.-A. (2014). Fasting protects liver from ischemic injury through Sirt1-mediated downregulation of circulating HMGB1 in mice. *J. Hepatol.* *61*, 301–308.

Romeo, S., Kozlitina, J., Xing, C., Pertsemlidis, A., Cox, D., Pennacchio, L.A., Boerwinkle, E., Cohen, J.C., and Hobbs, H.H. (2008). Genetic variation in PNPLA3 confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease. *Nat. Genet.* *40*, 1461–1465.

Ronfani, L., Ferraguti, M., Croci, L., Ovitt, C.E., Schöler, H.R., Consalez, G.G., and Bianchi, M.E. (2001). Hmgb2 is crucial for spermatogenesis. *Development* *128*, 1268–1273.

Rosen, E.D., Sarraf, P., Troy, A.E., Bradwin, G., Moore, K., Milstone, D.S., Spiegelman, B.M., and Mortensen, R.M. (1999). PPAR γ Is Required for the Differentiation of Adipose Tissue In Vivo and In Vitro. *Mol. Cell* 4, 611–617.

Rouhiainen, A., Zhao, X., Vanttola, P., Qian, K., Kuleskiy, E., Kuja-Panula, J., Gransalke, K., Grönholm, M., Unni, E., Meistrich, M., et al. (2016). HMGB4 is expressed by neuronal cells and affects the expression of genes involved in neural differentiation. *Sci. Rep.* 6.

Russell, D.W. (2003). The Enzymes, Regulation, and Genetics of Bile Acid Synthesis. *Annu. Rev. Biochem.* 72, 137–174.

Rybicka, K.K. (1996). Glycosomes — the organelles of glycogen metabolism. *Tissue Cell* 28, 253–265.

Sárkány, Z., Ikonen, T.P., Ferreira-da-Silva, F., Saraiva, M.J., Svergun, D., and Damas, A.M. (2011). Solution Structure of the Soluble Receptor for Advanced Glycation End Products (sRAGE). *J. Biol. Chem.* 286, 37525–37534.

Sato, T., Oouchi, M., Nagakubo, H., Chiba, T., Ogawa, S., Sato, C., Sugimura, K., and Fukuda, M. (1998). Effect of Pravastatin on Plasma Ketone Bodies in Diabetics with Hypercholesterolemia. *Tohoku J. Exp. Med.* 185, 25–29.

Scaffidi, P., Misteli, T., and Bianchi, M.E. (2002). Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *418*, 6.

Schadinger, S.E. (2005). PPAR 2 regulates lipogenesis and lipid accumulation in steatotic hepatocytes. *AJP Endocrinol. Metab.* 288, E1195–E1205.

Schaftingen, E. van (1989). A protein from rat liver confers to glucokinase the property of being antagonistically regulated by fructose 6-phosphate and fructose 1-phosphate. *Eur. J. Biochem.* 179, 179–184.

Scheja, L., and Buettner, C. (2016). Adipose Tissue DNL and Its Role in Metabolic Homeostasis. In *Hepatic De Novo Lipogenesis and Regulation of Metabolism*, (Springer, Cham), pp. 267–283.

Schiraldi, M., Raucci, A., Muñoz, L.M., Livoti, E., Celona, B., Venereau, E., Apuzzo, T., Marchis, F.D., Pedotti, M., Bachi, A., et al. (2012). HMGB1 promotes recruitment of inflammatory cells to damaged tissues by forming a complex with CXCL12 and signaling via CXCR4. *J. Exp. Med.* 209, 551–563.

Schleinitz, D., Klöting, N., Körner, A., Berndt, J., Reichenbächer, M., Tönjes, A., Ruschke, K., Böttcher, Y., Dietrich, K., Enigk, B., et al. (2010). Effect of Genetic Variation in the Human Fatty Acid Synthase Gene (FASN) on Obesity and Fat Depot-Specific mRNA Expression. *Obesity* *18*, 1218–1225.

Schmidt, A.M., Vianna, M., Gerlach, M., Brett, J., Ryan, J., Kao, J., Esposito, C., Hegarty, H., Hurley, W., and Clauss, M. (1992). Isolation and characterization of two binding proteins for advanced glycosylation end products from bovine lung which are present on the endothelial cell surface. *J. Biol. Chem.* *267*, 14987–14997.

Schonfeld, G. (2003). Familial hypobetalipoproteinemia a review. *J. Lipid Res.* *44*, 878–883.

Schultz, J.R., Tu, H., Luk, A., Repa, J.J., Medina, J.C., Li, L., Schwendner, S., Wang, S., Thoolen, M., Mangelsdorf, D.J., et al. (2000). Role of LXRs in control of lipogenesis. *Genes Dev.* *14*, 2831–2838.

Schupp, M., and Lazar, M.A. (2010). Endogenous Ligands for Nuclear Receptors: Digging Deeper. *J. Biol. Chem.* *285*, 40409–40415.

Schwimmer, J.B., Celedon, M.A., Lavine, J.E., Salem, R., Campbell, N., Schork, N.J., Shieh-morteza, M., Yokoo, T., Chavez, A., Middleton, M.S., et al. (2009). Heritability of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology* *136*, 1585–1592.

Sell, H., Habich, C., and Eckel, J. (2012). Adaptive immunity in obesity and insulin resistance. *Nat. Rev. Endocrinol.* *8*, 709–716.

Selva, D.M., Hogeveen, K.N., Innis, S.M., and Hammond, G.L. (2007). Monosaccharide-induced lipogenesis regulates the human hepatic sex hormone-binding globulin gene. *J. Clin. Invest.* *117*, 3979–3987.

Seyer, P., Vallois, D., Poitry-Yamate, C., Schütz, F., Metref, S., Tarussio, D., Maechler, P., Staels, B., Lanz, B., Grueter, R., et al. (2013). Hepatic glucose sensing is required to preserve β cell glucose competence. *J. Clin. Invest.* *123*, 1662–1676.

Sheng, Z., Otani, H., Brown, M.S., and Goldstein, J.L. (1995). Independent regulation of sterol regulatory element-binding proteins 1 and 2 in hamster liver. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *92*, 935–938.

Shichita, T., Ito, M., Morita, R., Komai, K., Noguchi, Y., Ooboshi, H., Koshida, R., Takahashi, S., Kodama, T., and Yoshimura, A. (2017). MAFB prevents excess inflammation after ischemic stroke by accelerating clearance of damage signals through MSR1. *Nat. Med.* *23*, 723–732.

Shimizu, T., Yamakuchi, M., Biswas, K.K., Aryal, B., Yamada, S., Hashiguchi, T., and Maruyama, I. (2016). HMGB1 is secreted by 3T3-L1 adipocytes through JNK signaling and the secretion is partially inhibited by adiponectin: HMGB1 Secretion from 3T3-L1 Adipocytes. *Obesity* *24*, 1913–1921.

Shin, J.-H., Kim, I.-D., Kim, S.-W., Lee, H.-K., Jin, Y., Park, J.-H., Kim, T.-K., Suh, C.-K., Kwak, J., Lee, K.-H., et al. (2015). Ethyl Pyruvate Inhibits HMGB1 Phosphorylation and Release by Chelating Calcium. *Mol. Med.* *20*, 649–657.

Shinar, D.M., Endo, N., Rutledge, S.J., Vogel, R., Rodan, G.A., and Schmidt, A. (1994). NER, a new member of the gene family encoding the human steroid hormone nuclear receptor. *Gene* *147*, 273–276.

Singh, R., Kaushik, S., Wang, Y., Xiang, Y., Novak, I., Komatsu, M., Tanaka, K., Cuervo, A.M., and Czaja, M.J. (2009). Autophagy regulates lipid metabolism. *Nature* *458*, 1131–1135.

Sinturel, F., Gerber, A., Mauvoisin, D., Wang, J., Gatfield, D., Stubblefield, J.J., Green, C.B., Gachon, F., and Schibler, U. (2017). Diurnal Oscillations in Liver Mass and Cell Size Accompany Ribosome Assembly Cycles. *Cell* *169*, 651-663.e14.

Sitia, G., Iannaccone, M., Müller, S., Bianchi, M.E., and Guidotti, L.G. (2006). Treatment with HMGB1 inhibitors diminishes CTL-induced liver disease in HBV transgenic mice. *J. Leukoc. Biol.* *81*, 100–107.

Skinner, J.R., Shew, T.M., Schwartz, D.M., Tzekov, A., Lepus, C.M., Abumrad, N.A., and Wolins, N.E. (2009). Diacylglycerol Enrichment of Endoplasmic Reticulum or Lipid Droplets Recruits Perilipin 3/TIP47 during Lipid Storage and Mobilization. *J. Biol. Chem.* *284*, 30941–30948.

Solomon, M.J., Strauss, F., and Varshavsky, A. (1986). A mammalian high mobility group protein recognizes any stretch of six A.T base pairs in duplex DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *83*, 1276–1280.

Speckmann, B., Walter, P.L., Alili, L., Reinehr, R., Sies, H., Klotz, L.-O., and Steinbrenner, H. (2008). Selenoprotein P expression is controlled through interaction of the coactivator PGC-1 α with FoxO1a and hepatocyte nuclear factor 4 α transcription factors. *Hepatology* *48*, 1998–2006.

Speliotes, E.K., Yerges-Armstrong, L.M., Wu, J., Hernaez, R., Kim, L.J., Palmer, C.D., Gudnason, V., Eiriksdottir, G., Garcia, M.E., Launer, L.J., et al. (2011). Genome-Wide Association Analysis Identifies Variants Associated with Nonalcoholic Fatty Liver Disease That Have Distinct Effects on Metabolic Traits. *PLoS Genet.* 7.

Staels, B., Rubenstrunk, A., Noel, B., Rigou, G., Delataille, P., Millatt, L.J., Baron, M., Lucas, A., Tailleux, A., Hum, D.W., et al. (2013). Hepatoprotective effects of the dual peroxisome proliferator-activated receptor alpha/delta agonist, GFT505, in rodent models of nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 58, 1941–1952.

Stefan, N., and Häring, H.-U. (2013). The role of hepatokines in metabolism. *Nat. Rev. Endocrinol.* 9, 144–152.

Stefan, N., Hennige, A.M., Staiger, H., Machann, J., Schick, F., Kröber, S.M., Machicao, F., Fritsche, A., and Häring, H.-U. (2006). Alpha2-Heremans-Schmid glycoprotein/fetuin-A is associated with insulin resistance and fat accumulation in the liver in humans. *Diabetes Care* 29, 853–857.

Stefan, N., Schick, F., and Häring, H.-U. (2010). Sex Hormone–Binding Globulin and Risk of Type 2 Diabetes.

Sterner, R., Vidali, G., and Allfrey, V.G. (1979). Studies of acetylation and deacetylation in high mobility group proteins. Identification of the sites of acetylation in HMG-1. *J. Biol. Chem.* 254, 11577–11583.

Stoekman, A.K., Ma, L., and Towle, H.C. (2004). Mlx Is the Functional Heteromeric Partner of the Carbohydrate Response Element-binding Protein in Glucose Regulation of Lipogenic Enzyme Genes. *J. Biol. Chem.* 279, 15662–15669.

Stone, S.J., Levin, M.C., Zhou, P., Han, J., Walther, T.C., and Farese, R.V. (2009). The Endoplasmic Reticulum Enzyme DGAT2 Is Found in Mitochondria-associated Membranes and Has a Mitochondrial Targeting Signal That Promotes Its Association with Mitochondria. *J. Biol. Chem.* 284, 5352–5361.

Su, X., Wang, H., Zhao, J., Pan, H., and Mao, L. (2011). Beneficial Effects of Ethyl Pyruvate through Inhibiting High-Mobility Group Box 1 Expression and TLR4/NF- κ B Pathway after Traumatic Brain Injury in the Rat. *Mediators Inflamm.* 2011.

Sul, H.S., Wise, L.S., Brown, M.L., and Rubin, C.S. (1984). Cloning of cDNA sequences for murine ATP-citrate lyase. Construction of recombinant plasmids using an immunopurified mRNA template and

evidence for the nutritional regulation of ATP-citrate lyase mRNA content in mouse liver. *J. Biol. Chem.* **259**, 1201–1205.

Sun, X., and Tang, D. (2014). HMGB1-dependent and -independent autophagy. *Autophagy* **10**, 1873–1876.

Sun, Z., Miller, R.A., Patel, R.T., Chen, J., Dhir, R., Wang, H., Zhang, D., Graham, M.J., Unterman, T.G., Shulman, G.I., et al. (2012). Hepatic Hdac3 promotes gluconeogenesis by repressing lipid synthesis and sequestration. *Nat. Med.* **18**, 934–942.

Tadie, J.-M., Bae, H.-B., Jiang, S., Park, D.W., Bell, C.P., Yang, H., Pittet, J.-F., Tracey, K., Thannickal, V.J., Abraham, E., et al. (2013). HMGB1 promotes neutrophil extracellular trap formation through interactions with Toll-like receptor 4. *Am. J. Physiol.-Lung Cell. Mol. Physiol.* **304**, L342–L349.

Tang, D., Kang, R., Livesey, K.M., Cheh, C.-W., Farkas, A., Loughran, P., Hoppe, G., Bianchi, M.E., Tracey, K.J., Zeh, H.J., et al. (2010). Endogenous HMGB1 regulates autophagy. *J. Cell Biol.* **190**, 881–892.

Tang, D., Kang, R., Livesey, K.M., Kroemer, G., Billiar, T.R., Van Houten, B., Zeh, H.J., and Lotze, M.T. (2011). High-Mobility Group Box 1 Is Essential for Mitochondrial Quality Control. *Cell Metab.* **13**, 701–711.

Tang, D., Billiar, T.R., and Lotze, M.T. (2012). A Janus Tale of Two Active High Mobility Group Box 1 (HMGB1) Redox States. *Mol. Med.* **18**, 1360–1362.

Tauchi-Sato, K., Ozeki, S., Houjou, T., Taguchi, R., and Fujimoto, T. (2002). The Surface of Lipid Droplets Is a Phospholipid Monolayer with a Unique Fatty Acid Composition. *J. Biol. Chem.* **277**, 44507–44512.

Temple, K.A., Cohen, R.N., Wondisford, S.R., Yu, C., Deplewski, D., and Wondisford, F.E. (2005). An Intact DNA-binding Domain Is Not Required for Peroxisome Proliferator-activated Receptor γ (PPAR γ) Binding and Activation on Some PPAR Response Elements. *J. Biol. Chem.* **280**, 3529–3540.

Tian, J., Avalos, A.M., Mao, S.-Y., Chen, B., Senthil, K., Wu, H., Parroche, P., Drabic, S., Golenbock, D., Sirois, C., et al. (2007). Toll-like receptor 9–dependent activation by DNA-containing immune complexes is mediated by HMGB1 and RAGE. *Nat. Immunol.* **8**, 487–496.

Tirone, M., Tran, N.L., Ceriotti, C., Gorzanelli, A., Canepari, M., Bottinelli, R., Raucci, A., Di Maggio, S., Santiago, C., Mellado, M., et al. (2017). High mobility group box 1 orchestrates tissue regeneration via CXCR4. *J. Exp. Med.* [jem.20160217](https://doi.org/10.1083/jem.20160217).

Titchenell, P.M., Quinn, W.J., Lu, M., Chu, Q., Lu, W., Li, C., Chen, H., Monks, B.R., Chen, J., Rabinowitz, J.D., et al. (2016). Direct Hepatocyte Insulin Signaling Is Required for Lipogenesis but Is Dispensable for the Suppression of Glucose Production. *Cell Metab.* *23*, 1154–1166.

Tsatsos, N.G., and Towle, H.C. (2006). Glucose activation of ChREBP in hepatocytes occurs via a two-step mechanism. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *340*, 449–456.

Tsung, A., Sahai, R., Tanaka, H., Nakao, A., Fink, M.P., Lotze, M.T., Yang, H., Li, J., Tracey, K.J., Geller, D.A., et al. (2005). The nuclear factor HMGB1 mediates hepatic injury after murine liver ischemia-reperfusion. *J. Exp. Med.* *201*, 1135–1143.

Tynnismaa, H., Raivio, T., Hakkarainen, A., Ortega-Alonso, A., Lundbom, N., Kaprio, J., Rissanen, A., Suomalainen, A., and Pietiläinen, K.H. (2011). Liver Fat But Not Other Adiposity Measures Influence Circulating FGF21 Levels in Healthy Young Adult Twins. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *96*, E351–E355.

Ulloa, L., Ochani, M., Yang, H., Tanovic, M., Halperin, D., Yang, R., Czura, C.J., Fink, M.P., and Tracey, K.J. (2002). Ethyl pyruvate prevents lethality in mice with established lethal sepsis and systemic inflammation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *99*, 12351–12356.

Vagelos, P.R., Alberts, A.W., and Martin, D.B. (1963). Studies on the Mechanism of Activation of Acetyl Coenzyme A Carboxylase by Citrate. *J. Biol. Chem.* *238*, 533–540.

Venereau, E., Casalgrandi, M., Schiraldi, M., Antoine, D.J., Cattaneo, A., De Marchis, F., Liu, J., Antonelli, A., Preti, A., Raeli, L., et al. (2012). Mutually exclusive redox forms of HMGB1 promote cell recruitment or proinflammatory cytokine release. *J. Exp. Med.* *209*, 1519–1528.

Venkataraman, R., Kellum, J.A., Song, M., and Fink, M.P. (2002). Resuscitation with Ringer's ethyl pyruvate solution prolongs survival and modulates plasma cytokine and nitrite/nitrate concentrations in a rat model of lipopolysaccharide-induced shock. *Shock Augusta Ga* *18*, 507–512.

Vijayakumar, A., Aryal, P., Wen, J., Syed, I., Vazirani, R.P., Moraes-Vieira, P.M., Camporez, J.P., Gallop, M.R., Perry, R.J., Peroni, O.D., et al. (2017). Absence of Carbohydrate Response Element Binding Protein in Adipocytes Causes Systemic Insulin Resistance and Impairs Glucose Transport. *Cell Rep.* *21*, 1021–1035.

Wake, K. (1980). Perisinusoidal Stellate Cells (Fat-Storing Cells, Interstitial Cells, Lipocytes), Their Related Structure in and around the Liver Sinusoids, and Vitamin A-Storing Cells in Extrahepatic Organs. In *International Review of Cytology*, (Elsevier), pp. 303–353.

Wang, H., Blom, O., Zhang, minghuang, and Tracey, K. (1999). HMG-1 as a Late Mediator of Endotoxin Lethality in Mice. *Science* 285, 248–251.

Wang, H., Qu, H., and Deng, H. (2015a). Plasma HMGB-1 Levels in Subjects with Obesity and Type 2 Diabetes: A Cross-Sectional Study in China. *PLoS ONE* 10.

Wang, J., He, G.-Z., Wang, Y.-K., Zhu, Q.-K., Chen, W., and Guo, T. (2015b). TLR4-HMGB1-, MyD88- and TRIF-dependent signaling in mouse intestinal ischemia/reperfusion injury. *World J. Gastroenterol.* 21, 8314–8325.

Wang, L., He, L., Bao, G., He, X., Fan, S., and Wang, H. (2016). Ionizing Radiation Induces HMGB1 Cytoplasmic Translocation and Extracellular Release. *Guo Ji Fang She Yi Xue He Yi Xue Za Zhi Int. J. Radiat. Med. Nucl. Med.* 40, 91–99.

Wang, Q., Ding, Q., Zhou, Y., Gou, X., Hou, L., Chen, S., Zhu, Z., and Xiong, L. (2009). Ethyl Pyruvate Attenuates Spinal Cord Ischemic Injury with a Wide Therapeutic Window through Inhibiting High-mobility Group Box 1 Release in Rabbits. *Anesthesiol. J. Am. Soc. Anesthesiol.* 110, 1279–1286.

Wang Qiong, Jiang Lei, Wang Jue, Li Shoufeng, Yu Yue, You Jia, Zeng Rong, Gao Xiang, Rui Liangyou, Li Wenjun, et al. (2009). Abrogation of hepatic ATP-citrate lyase protects against fatty liver and ameliorates hyperglycemia in leptin receptor-deficient mice. *Hepatology* 49, 1166–1175.

Watson, M., Stott, K., Fischl, H., Cato, L., and Thomas, J.O. (2014). Characterization of the interaction between HMGB1 and H3--a possible means of positioning HMGB1 in chromatin. *Nucleic Acids Res.* 42, 848–859.

Weir, H.M., Kraulis, P.J., Hill, C.S., Raine, A.R., Laue, E.D., and Thomas, J.O. (1993). Structure of the HMG box motif in the B-domain of HMG1. *EMBO J.* 12, 1311–1319.

Wellen, K.E., Hatzivassiliou, G., Sachdeva, U.M., Bui, T.V., Cross, J.R., and Thompson, C.B. (2009). ATP-Citrate Lyase Links Cellular Metabolism to Histone Acetylation. *Science* 324, 1076–1080.

Willner, I.R., Waters, B., Patil, S.R., Reuben, A., Morelli, J., and Riely, C.A. (2001). Ninety patients with nonalcoholic steatohepatitis: insulin resistance, familial tendency, and severity of disease. *Am. J. Gastroenterol.* 96, 2957–2961.

Wisse, E. (1970). An Electron Microscopic Study of the Fenestrated Endothelial Lining of Rat Liver Sinusoids. *J. Ultrastruct. Res.* 31, 125–150.

- Woo, Y.J., Taylor, M.D., Cohen, J.E., Jayasankar, V., Bish, L.T., Burdick, J., Pirolli, T.J., Berry, M.F., Hsu, V., and Grand, T. (2004). Ethyl pyruvate preserves cardiac function and attenuates oxidative injury after prolonged myocardial ischemia. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* *127*, 1262–1269.
- Xiang, M., Wang, P.-X., Wang, A.-B., Zhang, X.-J., Zhang, Y., Zhang, P., Mei, F.-H., Chen, M.-H., and Li, H. (2016). Targeting hepatic TRAF1-ASK1 signaling to improve inflammation, insulin resistance, and hepatic steatosis. *J. Hepatol.* *64*, 1365–1377.
- Xu, Y., Sumter, T.F., Bhattacharya, R., Tesfaye, A., Fuchs, E.J., Wood, L.J., Huso, D.L., and Resar, L.M.S. (2004). The HMG-I Oncogene Causes Highly Penetrant, Aggressive Lymphoid Malignancy in Transgenic Mice and Is Overexpressed in Human Leukemia. *Cancer Res.* *64*, 3371–3375.
- Yamaguchi, K., Yang, L., McCall, S., Huang, J., Yu, X.X., Pandey, S.K., Bhanot, S., Monia, B.P., Li, Y.-X., and Diehl, A.M. (2007). Inhibiting triglyceride synthesis improves hepatic steatosis but exacerbates liver damage and fibrosis in obese mice with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* *45*, 1366–1374.
- Yamamoto, T., Shimano, H., Inoue, N., Nakagawa, Y., Matsuzaka, T., Takahashi, A., Yahagi, N., Sone, H., Suzuki, H., Toyoshima, H., et al. (2007). Protein Kinase A Suppresses Sterol Regulatory Element-binding Protein-1C Expression via Phosphorylation of Liver X Receptor in the Liver. *J. Biol. Chem.* *282*, 11687–11695.
- Yamashita, H., Takenoshita, M., Sakurai, M., Bruick, R.K., Henzel, W.J., Shillinglaw, W., Arnot, D., and Uyeda, K. (2001). A glucose-responsive transcription factor that regulates carbohydrate metabolism in the liver. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *98*, 9116–9121.
- Yanai, H., Matsuda, A., An, J., Koshiba, R., Nishio, J., Negishi, H., Ikushima, H., Onoe, T., Ohdan, H., Yoshida, N., et al. (2013). Conditional ablation of HMGB1 in mice reveals its protective function against endotoxemia and bacterial infection. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *110*, 20699–20704.
- Yang, C., Lu, W., Lin, T., You, P., Ye, M., Huang, Y., Jiang, X., Wang, C., Wang, F., Lee, M.-H., et al. (2013). Activation of Liver FGF21 in hepatocarcinogenesis and during hepatic stress. *BMC Gastroenterol.* *13*, 67.
- Yang, H., Ochani, M., Li, J., Qiang, X., Tanovic, M., Harris, H.E., Susarla, S.M., Ulloa, L., Wang, H., DiRaimo, R., et al. (2004). Reversing established sepsis with antagonists of endogenous high-mobility group box 1. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *101*, 296–301.

- Yang, H., Hreggvidsdottir, H.S., Palmblad, K., Wang, H., Ochani, M., Li, J., Lu, B., Chavan, S., Rosas-Ballina, M., Al-Abed, Y., et al. (2010). A critical cysteine is required for HMGB1 binding to Toll-like receptor 4 and activation of macrophage cytokine release. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *107*, 11942–11947.
- Yang, H., Lundbäck, P., Ottosson, L., Erlandsson-Harris, H., Venereau, E., Bianchi, M.E., Al-Abed, Y., Andersson, U., Tracey, K.J., and Antoine, D.J. (2011). Redox Modification of Cysteine Residues Regulates the Cytokine Activity of High Mobility Group Box-1 (HMGB1). *10*.
- Yang, H., Wang, H., Ju, Z., Ragab, A.A., Lundbäck, P., Long, W., Valdes-Ferrer, S.I., He, M., Pribis, J.P., Li, J., et al. (2015). MD-2 is required for disulfide HMGB1-dependent TLR4 signaling. *J. Exp. Med.* *212*, 5–14.
- Yang, L., Jung, Y., Omenetti, A., Witek, R.P., Choi, S., Vandongen, H.M., Huang, J., Alpini, G.D., and Diehl, A.M. (2008a). Fate-Mapping Evidence that Hepatic Stellate Cells are Epithelial Progenitors in Adult Mouse Livers. *Stem Cells Dayt. Ohio* *26*, 2104–2113.
- Yang, L., Wang, W.-H., Qiu, W.-L., Guo, Z., Bi, E., and Xu, C.-R. (2017). A single-cell transcriptomic analysis reveals precise pathways and regulatory mechanisms underlying hepatoblast differentiation. *Hepatology* *66*, 1387–1401.
- Yang, Z.-Y., Ling, Y., Yin, T., Tao, J., Xiong, J.-X., Wu, H.-S., and Wang, C.-Y. (2008b). Delayed ethyl pyruvate therapy attenuates experimental severe acute pancreatitis via reduced serum high mobility group box 1 levels in rats. *World J. Gastroenterol. WJG* *14*, 4546–4550.
- Yao, L., Heuser-Baker, J., Herlea-Pana, O., Zhang, N., Szweda, L.I., Griffin, T.M., and Barlic-Dicen, J. (2014). Deficiency in adipocyte chemokine receptor CXCR4 exacerbates obesity and compromises thermoregulatory responses of brown adipose tissue in a mouse model of diet-induced obesity. *FASEB J.* *28*, 4534–4550.
- Yellaturu, C.R., Deng, X., Park, E.A., Raghov, R., and Elam, M.B. (2009). Insulin Enhances the Biogenesis of Nuclear Sterol Regulatory Element-binding Protein (SREBP)-1c by Posttranscriptional Down-regulation of Insig-2A and Its Dissociation from SREBP Cleavage-activating Protein (SCAP)-SREBP-1c Complex. *J. Biol. Chem.* *284*, 31726–31734.
- Yen, C.-L.E., Stone, S.J., Koliwad, S., Harris, C., and Farese, R.V. (2008). DGAT enzymes and triacylglycerol biosynthesis. *J. Lipid Res.* *49*, 2283–2301.

- Yie, J., Merika, M., Munshi, N., Chen, G., and Thanos, D. (1999). The role of HMG I(Y) in the assembly and function of the IFN-beta enhanceosome. *EMBO J.* *18*, 3074–3089.
- Youn, J.H., and Shin, J.-S. (2006). Nucleocytoplasmic Shuttling of HMGB1 Is Regulated by Phosphorylation That Redirects It toward Secretion. *J. Immunol.* *177*, 7889–7897.
- Youn, J.H., Oh, Y.J., Kim, E.S., Choi, J.E., and Shin, J.-S. (2008). High Mobility Group Box 1 Protein Binding to Lipopolysaccharide Facilitates Transfer of Lipopolysaccharide to CD14 and Enhances Lipopolysaccharide-Mediated TNF- Production in Human Monocytes. *J. Immunol.* *180*, 5067–5074.
- Younossi, Z.M., Blissett, D., Blissett, R., Henry, L., Stepanova, M., Younossi, Y., Racila, A., Hunt, S., and Beckerman, R. (2016a). The economic and clinical burden of nonalcoholic fatty liver disease in the United States and Europe. *Hepatology* *64*, 1577–1586.
- Younossi, Z.M., Koenig, A.B., Abdelatif, D., Fazel, Y., Henry, L., and Wymer, M. (2016b). Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease—Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology* *64*, 73–84.
- Yu, Y.-M., Kim, J.-B., Lee, K.-W., Yun Kim, S., Han, P.-L., and Lee, J.-K. (2005). Inhibition of the Cerebral Ischemic Injury by Ethyl Pyruvate With a Wide Therapeutic Window. *Stroke* *36*, 2238–2243.
- Yuan, X., Waterworth, D., Perry, J.R.B., Lim, N., Song, K., Chambers, J.C., Zhang, W., Vollenweider, P., Stirnadel, H., Johnson, T., et al. (2008). Population-Based Genome-wide Association Studies Reveal Six Loci Influencing Plasma Levels of Liver Enzymes. *Am. J. Hum. Genet.* *83*, 520–528.
- Zhang, F., Su, X., Huang, G., Xin, X.-F., Cao, E.-H., Shi, Y., and Song, Y. (2017a). sRAGE alleviates neutrophilic asthma by blocking HMGB1/RAGE signalling in airway dendritic cells. *Sci. Rep.* *7*, 14268.
- Zhang, Y., Rauch, U., and Perez, M.-T.R. (2003). Accumulation of neurocan, a brain chondroitin sulfate proteoglycan, in association with the retinal vasculature in RCS rats. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* *44*, 1252–1261.
- Zhang, Y., Breevoort, S.R., Angdisen, J., Fu, M., Schmidt, D.R., Holmstrom, S.R., Kliewer, S.A., Mangelsdorf, D.J., and Schulman, I.G. (2012). Liver LXR α expression is crucial for whole body cholesterol homeostasis and reverse cholesterol transport in mice. *J. Clin. Invest.* *122*, 1688–1699.

Zhang, Y., Papazyan, R., Damle, M., Fang, B., Jager, J., Feng, D., Peed, L.C., Guan, D., Sun, Z., and Lazar, M.A. (2017b). The hepatic circadian clock fine-tunes the lipogenic response to feeding through ROR α / γ . *Genes Dev.*

Zhang, Y.-L., Hernandez-Ono, A., Ko, C., Yasunaga, K., Huang, L.-S., and Ginsberg, H.N. (2004). Regulation of Hepatic Apolipoprotein B-lipoprotein Assembly and Secretion by the Availability of Fatty Acids. *J. Biol. Chem.* 279, 19362–19374.

Zhao, L.F., Iwasaki, Y., Zhe, W., Nishiyama, M., Taguchi, T., Tsugita, M., Kambayashi, M., Hashimoto, K., and Terada, Y. (2010a). Hormonal Regulation of Acetyl-CoA Carboxylase Isoenzyme Gene Transcription. *Endocr. J.* 57, 317–324.

Zhao, S., Xu, W., Jiang, W., Yu, W., Lin, Y., Zhang, T., Yao, J., Zhou, L., Zeng, Y., Li, H., et al. (2010b). Regulation of Cellular Metabolism by Protein Lysine Acetylation. *Science* 327, 1000–1004.

Zhu, Y., Qi, C., Jain, S., Rao, M.S., and Reddy, J.K. (1997). Isolation and Characterization of PBP, a Protein That Interacts with Peroxisome Proliferator-activated Receptor. *J. Biol. Chem.* 272, 25500–25506.

Zhu, Y., Yan, Y., Gius, D.R., and Vassilopoulos, A. (2013). Metabolic regulation of sirtuins upon fasting and the implication for cancer. *Curr. Opin. Oncol.* 25, 630–636.

Zigmond, E., Samia-Grinberg, S., Pasmanik-Chor, M., Brazowski, E., Shibolet, O., Halpern, Z., and Varol, C. (2014). Infiltrating Monocyte-Derived Macrophages and Resident Kupffer Cells Display Different Ontogeny and Functions in Acute Liver Injury. *J. Immunol.* 193, 344–353.