



# **Tsukushi - une nouvelle hépatokine surproduite en réponse à la stéatose hépatique non-alcoolique.**

**Thèse**

**Mathilde Mouchiroud**

**Doctorat en médecine moléculaire**  
Philosophiæ doctor (Ph. D.)

Québec, Canada

**Tsukushi - une nouvelle hépatokine  
surproduite en réponse à la stéatose  
hépatique non-alcoolique.**

**Thèse**

**Mathilde Mouchiroud**

Sous la direction de :

Mathieu Laplante, directeur de recherche

## Résumé

L'obésité, dont la prévalence ne cesse d'augmenter, est une préoccupation majeure des services de santé. Elle est associée à de nombreuses pathologies incluant la résistance à l'insuline, le diabète de type 2, la stéatose hépatique, la dyslipidémie, et les maladies cardiovasculaires. La stéatose hépatique non-alcoolique (NAFLD), caractérisée par une accumulation excessive de gras dans le foie, est elle-même associée à la résistance à l'insuline, à l'athérosclérose, et aux maladies cardiovasculaires. En contexte pathologique, le foie sécrète des facteurs nommés hépatokines, qui ont la capacité d'affecter le foie lui-même et les tissus périphériques. Ces facteurs représentent de potentiels biomarqueurs de la santé hépatique et/ou de potentielles cibles thérapeutiques de la NAFLD et des pathologies associées. Notre objectif a été d'identifier et de caractériser de nouvelles hépatokines exprimées et sécrétées en réponse à la stéatose hépatique en contexte d'obésité.

Les travaux décrits dans cette thèse identifient Tsukushi (TSK) comme une nouvelle hépatokine exprimée et sécrétée majoritairement par le foie en réponse à l'obésité dans plusieurs modèles murins. TSK est associée à la quantité de triglycérides (TG) hépatiques indépendamment de l'obésité. Le stress du réticulum endoplasmique et l'inflammation, des conditions fortement associées à la NAFLD, régulent TSK. Les études réalisées montrent que TSK n'a pas de rôle dans le développement et la sévérité de la NAFLD. En revanche, des études chez la souris ont permis de mettre en évidence que la surproduction de TSK réduit les niveaux de cholestérol plasmatique et plus particulièrement les particules de haute densité (HDL, high-density lipoprotein), la synthèse d'acides biliaires et le transport inverse de cholestérol. Chez l'humain, l'expression de *Tsk* est augmentée chez les individus obèses ayant une forte quantité de TG hépatiques et une plus grande inflammation. De plus, TSK est fortement présente dans le plasma de patients souffrants de défaillance hépatique sévère induite par l'acétaminophène.

Nous proposons un modèle dans lequel TSK est surproduite en réponse à la NAFLD indépendamment de l'obésité, et induit une réduction du transport inverse du cholestérol probablement dans le but de protéger le foie. Bien que l'effet initial de TSK puisse être bénéfique, une action soutenue dans l'obésité et la NAFLD pourrait contribuer à l'athérosclérose en limitant le transport inverse du cholestérol. L'ensemble de ces résultats montrent que TSK pourrait représenter un nouveau biomarqueur du stress hépatique liant la NAFLD à la dyslipidémie athérogène et à l'athérosclérose.

# Abstract

Obesity, whose prevalence is constantly increasing, is a major concern of the health services. It is associated with many pathologies including insulin resistance, type 2 diabetes, fatty liver disease, dyslipidemia and cardiovascular diseases. Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD), characterized by excessive accumulation of fat in the liver, is associated with insulin resistance, atherosclerosis and cardiovascular diseases. In a pathological context, the liver secretes factors called hepatokines, which have the ability to affect the liver itself and peripheral tissues. These factors represent potential biomarkers of liver health and / or potential therapeutic targets of NAFLD and its associated pathologies. Our objective was to identify and characterize new hepatokines expressed and secreted in response to fatty liver in the context of obesity.

The work described in this thesis identifies Tsukushi (TSK) as a new hepatokine expressed and secreted mainly by the liver in response to obesity in several mouse models. TSK is associated with the amount of liver triglycerides (TG) regardless of obesity. Endoplasmic reticulum stress and inflammation, conditions strongly associated with NAFLD, regulate TSK. Studies show that TSK has no role in the development and severity of NAFLD. In contrast, studies in mice have shown that the overproduction of TSK reduces plasma cholesterol levels and more particularly high density lipoprotein (HDL), bile acid synthesis and reverse cholesterol transport. In humans, the expression of *Tsk* is increased in obese individuals with a large amount of hepatic TG and greater inflammation. In addition, TSK is strongly present in the plasma of patients with severe acetaminophen-induced liver failure.

We propose a model in which TSK is overproduced in response to NAFLD regardless of obesity, and induces a reduction in reverse cholesterol transport likely to protect the liver. While the initial effect of TSK may be beneficial, sustained action in obesity and NAFLD may contribute to atherosclerosis by limiting the reverse cholesterol transport. All of these results show that TSK could represent a new biomarker of hepatic stress linking NAFLD to atherogenic dyslipidemia and atherosclerosis.

# Table des matières

Résumé.....	ii
Abstract.....	iii
Table des matières.....	iv
Liste des figures.....	vii
Liste des tableaux.....	ix
Liste des abréviations.....	x
Remerciements.....	xvii
Avant-propos.....	xx
Articles présentés.....	xxi
Introduction.....	1
1 L'obésité.....	1
1.1 Généralités.....	1
1.2 Obésité : expansion et dysfonction du tissu adipeux.....	1
1.2.1 Le tissu adipeux blanc.....	2
1.2.2 Les tissus adipeux brun et beige.....	3
2 Les pathologies associées à l'obésité.....	5
2.1 La résistance à l'insuline et le diabète de type 2.....	6
2.1.1 La signalisation normale de l'insuline.....	6
2.1.2 La résistance à l'insuline.....	8
2.2 Les dyslipidémies.....	15
2.2.1 Les lipoprotéines.....	15
2.2.2 Les caractéristiques de la dyslipidémie.....	17
2.2.3 L'athérosclérose.....	18
2.2.4 L'efflux de cholestérol.....	19
2.3 Les maladies cardiovasculaires.....	21
2.4 Les autres comorbidités de l'obésité.....	22

3	La stéatose hépatique non-alcoolique .....	23
3.1	Généralités sur la stéatose hépatique non-alcoolique.....	23
3.2	Le développement de la NAFLD .....	23
3.2.1	La source de lipides dans le foie et leur devenir.....	24
3.2.2	Le stress du réticulum endoplasmique .....	31
3.2.3	L'inflammation.....	31
3.2.4	La fibrose hépatique .....	35
3.3	Le diagnostic et le traitement de la NAFLD .....	38
3.4	La relation entre la NAFLD et l'athérosclérose .....	39
4	Les hépatokines .....	41
4.1	Qu'est-ce qu'une hépatokine? .....	41
4.2	Les hépatokines, la NAFLD et l'obésité .....	41
	Résumé .....	53
	Problématique et objectifs de travaux .....	54
	Problématique .....	54
	Objectifs des travaux .....	55
	Chapitre 1 .....	56
	THE HEPATOKINE TSUKUSHI IS RELEASED IN RESPONSE TO NAFLD AND IMPACTS CHOLESTEROL HOMEOSTASIS .....	56
	Avant-propos .....	57
	Résumé .....	58
	Abstract .....	59
	Introduction.....	60
	Results .....	62
	Discussion .....	70
	Material and methods .....	74
	Acknowledgments.....	80

Author contributions.....	80
Figures .....	81
Bibliography.....	93
Supplementary figures.....	98
Chapitre 2.....	108
THE HEPATOKINE TSK DOES NOT AFFECT BROWN FAT THERMOGENIC CAPACITY, BODY WEIGHT GAIN AND GLUCOSE HOMEOSTASIS .....	108
Avant-propos .....	109
Résumé .....	110
Abstract .....	111
1. Introduction.....	112
2. Material and methods .....	114
3. Results .....	117
4. Discussion .....	120
5. Conclusion.....	122
Acknowledgments.....	122
Figures .....	123
References .....	128
Supplementary figures.....	130
Discussion .....	132
Conclusion.....	151
Bibliographie.....	152

# Liste des figures

## Introduction

Figure 1: Adipocytes blanc, brun et beige.....	3
Figure 2: La voie de signalisation de l'insuline. ....	7
Figure 3: Les DAG (a.) et les céramides (b.) dans la résistance à l'insuline. ....	9
Figure 4: La cascade de signalisation de la réponse UPR. ....	14
Figure 5: Schéma du métabolisme des lipoprotéines.....	17
Figure 6: Transport de cholestérol inverse.....	20
Figure 7: Développement et progression de la NAFLD.....	24
Figure 8: Éléments impliqués dans le développement de la NAFLD.....	26
Figure 9: Communication entre les cellules immunitaires en présence d'inflammation dans le foie.....	33
Figure 10: Voies d'activation des cellules hépatiques stellaires.....	37
Figure 11: Lien entre la résistance à l'insuline, la dyslipidémie métabolique et l'athérosclérose.....	40
Figure 12: Stéatose hépatique, sécrétion d'hépatokines et dérégulation métabolique. ....	42

## Chapitre 1

Figure 1: TSK is a hepatokine induced by obesity.....	81
Figure 2: <i>Tsk</i> expression correlates with liver steatosis in multiple mouse models.....	83
Figure 3: ER stress and inflammatory mediators promote <i>Tsk</i> expression and release.....	85
Figure 4: TSK levels are increased in response to steatosis and liver damage in humans	87
Figure 5: TSK does not affect NAFLD development.....	89
Figure 6: TSK impacts on systemic cholesterol homeostasis.....	91
Figure S1: TSK is a hepatokine induced by obesity.....	98
Figure S2: <i>Tsk</i> expression correlates with liver steatosis in multiple mouse models.....	100
Figure S3: ER stress and inflammatory mediators promote <i>Tsk</i> expression and release.....	101
Figure S4: TSK levels are increased in response to steatosis and liver damage in humans .....	103

Figure S5: TSK does not affect NAFLD development.....	104
Figure S6: TSK impacts on systemic cholesterol homeostasis.....	106

## **Chapitre 2**

Figure 1: Loss of TSK does not affect BAT thermogenic capacity.....	123
Figure 2: Loss of TSK does not protect mice against obesity development.....	125
Figure 3: Loss of TSK does not improve glucose homeostasis.....	126
Figure 4: Overexpression of TSK does not affect BAT thermogenic capacity, body weight and glucose homeostasis.....	127
Figure S1: TSK loss does not affect BAT thermogenesis activation in response to a cold challenge.....	130
Figure S2: The TSK null mouse model used in our study does not show delay in hair follicle development.....	131

## **Discussion**

Figure 13: Analyse phylogénétique et organisation chromosomique des classes de SLRP chez l'humains. ....	133
Figure 14: Schéma bilan de l'étude : « Tsukushi : une nouvelle hépatokine surproduite en réponse à la NAFLD ».....	142

## Liste des tableaux

Tableau 1: Les hépatokines associées avec la NAFLD et la résistance à l'insuline. .... 52

## Liste des abréviations

<b>Abréviations</b>	<b>Définitions</b>
<b>4EBP1</b>	<i>Eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 1</i>
<b>7aC4</b>	<i>7 Alpha-hydroxy-4-cholesten-3-one</i>
<b>AAV</b>	<i>Adeno-associated virus</i>
<b>ABCA</b>	<i>ATP Binding Cassette Subfamily A</i>
<b>ABCG</b>	<i>ATP Binding Cassette Subfamily G</i>
<b>ACS</b>	<i>Acetyl-CoA synthetase</i>
<b>ADN</b>	Acide désoxyribonucléique
<b>AG</b>	Acide gras
<b>ALT</b>	<i>Alanine aminotransferase</i>
<b>AMPc</b>	Adénosine 3',5'-monophosphate cyclique
<b>AMPk</b>	Protéine kinase active par l'adénosine monophosphate
<b>ANGPTL4</b>	<i>Angiopoietin-like protein 4</i>
<b>Apo</b>	Apolipoprotéine
<b>ARN</b>	Acide ribonucléique
<b>ARNm</b>	Acide ribonucléique messenger
<b>AS160</b>	<i>AKT substrate of 160kDa</i>
<b>ASK1</b>	<i>Apoptosis signal-regulating kinase 1</i>
<b>AST</b>	<i>Aspartate aminotransferase</i>
<b>ATF</b>	<i>Activating transcription factor</i>
<b>ATGL</b>	Lipase des triglycérides du tissu adipeux
<b>ATP</b>	Adénosine triphosphate
<b>Bgn</b>	Biglycan
<b>BMP</b>	<i>Bone morphogenic protein</i>
<b>C/EBP</b>	<i>CCAAT/enhancer binding protein</i>
<b>CCL4</b>	Tétrachlorure de carbone
<b>CD36</b>	<i>Cluster of differentiation 36</i>
<b>CETP</b>	Enzyme de transfert d'esters de cholestérol
<b>CHAD</b>	<i>Chondroadherin</i>
<b>CHOP</b>	<i>C/EBP homologous protein</i>
<b>CIDEA</b>	<i>Cell death-inducing DNA fragmentation factor alpha-like effector A</i>
<b>CPT-1</b>	Carnitine palmitoyltransférase-1
<b>CPT-2</b>	Carnitine palmitoyltransférase-2

<b>CREBH</b>	<i>Cyclic adenosine monophosphate (cAMP)-responsive element-binding protein H</i>
<b>CRISPR/Cas9</b>	<i>Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)-associated protein-9 nuclease</i>
<b>CSH</b>	<i>Cellule stellaire hépatique</i>
<b>CTGF</b>	<i>Connective tissue growth factor</i>
<b>Cyp7a1</b>	<i>Cytochrome P450 Family 7 Subfamily A Member 1</i>
<b>Cyp8b1</b>	<i>Cytochrome P450 Family 8 Subfamily B Member 1</i>
<b>DAG</b>	<i>Diacylglycérol</i>
<b>DAMP</b>	<i>Damaged associated molecular patterns</i>
<b>Dcn</b>	<i>Decorin</i>
<b>DIO2</b>	<i>Type 2 iodothyronine deiodinase</i>
<b>DPP4</b>	<i>Dipeptidyl peptidase-4</i>
<b>EGF</b>	<i>Epidermal growth factor</i>
<b>eiF2<math>\alpha</math></b>	<i>Eukaryotic Translation Initiation Factor 2</i>
<b>ERK1/2</b>	<i>Extracellular signal-regulated kinases</i>
<b>ERO</b>	<i>Espèces réactive à l'oxygène</i>
<b>FABP</b>	<i>Protéine de liaison aux acides gras</i>
<b>FADH2</b>	<i>Flavin adenine dinucleotide (forme hydroquinone)</i>
<b>FAS</b>	<i>Fatty acid synthase</i>
<b>FATP-1</b>	<i>Protéine de transport des acides gras-1</i>
<b>FBXW7</b>	<i>F-box/WD repeat-containing protein 7</i>
<b>FGF21</b>	<i>Fibroblast growth factor 21</i>
<b>Fmod</b>	<i>Fibromodulin</i>
<b>FOXO</b>	<i>Forkhead-box, type O</i>
<b>FXR</b>	<i>Farnesoid X receptor</i>
<b>G6Pase</b>	<i>Glucose-6 phosphatase</i>
<b>GAG</b>	<i>Glucosaminoglycane</i>
<b>GIP</b>	<i>Gastric inhibitory polypeptide</i>
<b>GLP-1</b>	<i>Glucagon-like peptide-1</i>
<b>GLUT4</b>	<i>Transporteur de glucose type 4</i>
<b>GRP78</b>	<i>Glucose regulated protein 78</i>
<b>GSK3</b>	<i>Glycogen synthase kinase 3</i>
<b>HDL</b>	<i>High density lipoprotein</i>
<b>HFREP1</b>	<i>Hepatocyte-derived fibrinogen-related protein 1</i>
<b>HMGB1</b>	<i>High mobility group box 1</i>

<b>HSL</b>	<i>Lipase hormono-sensible</i>
<b>IDL</b>	Lipoprotéine de densité intermédiaire
<b>IGFR</b>	<i>Insulin-like growth factor receptor</i>
<b>Ikk<math>\beta</math></b>	<i>Inhibitor of nuclear factor kappa-b kinase subunit b</i>
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	<i>Interleukin-1<math>\beta</math></i>
<b>IL-10</b>	<i>Interleukin-10</i>
<b>IL-6</b>	<i>Interleukin-6</i>
<b>IMC</b>	Indice de masse corporel
<b>INF-<math>\gamma</math></b>	<i>Interferon gamma</i>
<b>IRE1<math>\alpha</math></b>	<i>Inositol requiring enzyme-1a</i>
<b>IRM</b>	Imagerie à résonance magnétique
<b>IRS</b>	Substrat du récepteur de l'insuline
<b>IRTK</b>	<i>Insulin-induced receptor tyrosine kinase</i>
<b>JNK</b>	<i>c-Jun N-terminal kinase</i>
<b>kg</b>	Kilogramme
<b>KO</b>	<i>Knock-out</i>
<b>LDL</b>	<i>Low density lipoprotein</i>
<b>LDN</b>	Lipogenèse <i>de novo</i>
<b>LECT2</b>	<i>Leukocyte cell-derived chemotaxin 2</i>
<b>LIPC</b>	Triglycéride lipase hépatique
<b>Lp(a)</b>	<i>Lipoprotein a</i>
<b>LPL</b>	Lipase lipoprotéine
<b>LPS</b>	<i>Lipopolysaccharide</i>
<b>LRP1</b>	<i>Low density lipoprotein receptor-related protein 1</i>
<b>Lum</b>	<i>Lumican</i>
<b>Lymphocyte B</b>	Lymphocyte de la moelle osseuse (bone marrow)
<b>Lymphocyte T</b>	Lymphocyte du thymus
<b>Lymphocyte Th</b>	Lymphocyte T helper
<b>m</b>	Mètre
<b>M1</b>	Macrophages pro-inflammatoires
<b>M2</b>	Macrophages anti-inflammatoires
<b>MAPK</b>	Protéine kinase activée par les signaux mitogènes
<b>MCD</b>	<i>Methionine deficient diet</i>
<b>MCP-1</b>	Protéine attractive des monocytes-1
<b>MCV</b>	Maladies cardiovasculaires

<b>MEC</b>	Matrice extracellulaire
<b>MMP</b>	<i>Matrix metalloproteinases</i>
<b>mTOR</b>	<i>Molecular target of rapamycin</i>
<b>NADH</b>	<i>Nicotinamide adenine dinucleotide (forme réduite)</i>
<b>NAFLD</b>	Stéatose hépatique non-alcoolique
<b>NASH</b>	Stéatohépatite
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	<i>Nuclear factor-<math>\kappa</math>B</i>
<b>NK</b>	<i>Natural killer</i>
<b>NLR</b>	<i>Nucleotide-binding Oligomerization Domain proteins (NOD)-like receptor</i>
<b>Nyx</b>	<i>Nyctalopin</i>
<b>p70S6K</b>	<i>Ribosomal protein S6 kinase beta-1 (S6K1)</i>
<b>PAI-1</b>	<i>Plasminogen activator inhibitor-1</i>
<b>PAMP</b>	<i>Pathogen associated molecular patterns</i>
<b>PDGF</b>	<i>Platelet-derived growth factor</i>
<b>PDK-1</b>	Pyruvate déshydrogénase kinase 1
<b>PEDF</b>	<i>Pigment epithelium-derived factor</i>
<b>PEPCK</b>	<i>Phosphoenolpyruvate carboxykinase</i>
<b>PERK</b>	<i>Protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase</i>
<b>PGC1<math>\alpha</math></b>	<i>Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma Coactivator 1-Alpha</i>
<b>PI3K</b>	<i>Phosphatidylinositol-3 kinase</i>
<b>PIP2</b>	<i>Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate</i>
<b>PIP3</b>	<i>Phosphatidylinositol (3,4,5)-triphosphate</i>
<b>PKA</b>	Protéine kinase A
<b>PKB/AKT</b>	Protéine kinase B/AKT
<b>PKC</b>	Protéine kinase C
<b>PP2A</b>	<i>Protein phosphatase 2</i>
<b>PPAR</b>	Récepteur activé par les proliférateurs des peroxysomes
<b>PRDM16</b>	<i>PR domain containing16</i>
<b>PRR</b>	<i>Pattern recognition receptor</i>
<b>PCSK9</b>	Proprotéine convertase subtilisine/kexine de type 9
<b>PXR</b>	<i>Pregnane X receptor</i>
<b>RBP4</b>	<i>Retinol binding protein 4</i>
<b>RE</b>	Réticulum endoplasmique
<b>SCD-1</b>	Stéaroyl-CoA désaturase-1
<b>SeP</b>	<i>Selenoprotein P</i>

<b>shARN</b>	Acide ribonucléique en épingle à cheveux ( <i>short hairpin</i> ARN)
<b>SHBG</b>	<i>Sex hormone-binding globulin</i>
<b>SLRP</b>	<i>Small leucine-rich proteoglycan</i>
<b>SOCS3</b>	<i>Suppressor of cytokines signaling 3</i>
<b>SRB-I</b>	<i>Scavenger receptor class B type 1</i>
<b>SREBF</b>	<i>Sterol regulatory element-binding protein gene</i>
<b>SREBP</b>	<i>Sterol regulatory element-binding proteins</i>
<b>SXR</b>	<i>Steroid and xenobiotic receptor</i>
<b>T3</b>	<i>Triiodothyronine</i>
<b>TA</b>	Tissu adipeux
<b>TAB</b>	Tissu adipeux blanc
<b>TABr</b>	Tissu adipeux brun
<b>TG</b>	Triglycéride
<b>TGF-β</b>	Facteur de croissance transformant-β
<b>TGR5</b>	<i>G-protein-coupled bile acid receptor (Gpbar1)</i>
<b>TH</b>	<i>Tyrosine hydroxylase</i>
<b>Thr</b>	Thréonine
<b>TIMP</b>	<i>Tissue inhibitors of metalloproteinases</i>
<b>TLR</b>	<i>Toll like receptor</i>
<b>TNF-α</b>	Facteur de nécrose tumorale-α
<b>TRB3</b>	<i>Tribblesrelated protein 3</i>
<b>TSK</b>	Tsukushi
<b>Tyr</b>	Tyrosine
<b>UCP1</b>	Protéine découplante 1 ( <i>uncoupling protein-1</i> )
<b>UPR</b>	<i>Unfolded protein response</i>
<b>VDR</b>	<i>Vitamin D receptor</i>
<b>VEGF</b>	Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire
<b>VLDL</b>	<i>Very low density lipoprotein</i>
<b>WT</b>	Sauvage ( <i>wild type</i> )
<b>XBP1</b>	<i>X-box-binding protein 1</i>
<b>Xnr2</b>	<i>Xenopus nodal-related gene-2</i>

*À mon grand-père.*

*Success is not final, failure is not fatal:  
it is the courage to continue that counts.*

***Winston Churchill***

## Remerciements

Le doctorat est une grande aventure dont nous sommes le personnage principal. Tout au long du chemin se trouve des obstacles, des défis, des déceptions et des instants de doute. Bien entendu, il y a également des moments de joie et de belles rencontres. À la fin de cet épisode, il est temps de se poser pour écrire son histoire. On se rend alors compte que tout le chemin parcouru, le travail réalisé, les épreuves surmontées, et notre évolution autant professionnelle que personnelle, ont été possibles grâce à la participation de nombreuses personnes. Voici que mon aventure se termine. Il est temps pour moi de témoigner toute ma gratitude aux personnes qui m'ont permis d'accomplir ce défi personnel.

Pour commencer, je souhaite remercier mon directeur de thèse, le Dr Mathieu Laplante, qui a grandement contribué à mon développement scientifique et personnel. Merci Mathieu de m'avoir donné une chance et accueilli dans ton laboratoire. Tu m'as toujours traité d'égal à égal ce qui m'a permis de développer de l'assurance et de l'autonomie. Merci pour ta patience, ta générosité, tes encouragements et ta disponibilité. Je te remercie de m'avoir soutenu dans les moments plus difficiles du projet. Tu as cette capacité à toujours rester positif même lorsque tout semble négatif, ce qui est une force pour passer à travers les tempêtes. Ta passion pour la recherche, ta persévérance, ta rigueur et ton accessibilité font de toi un mentor exemplaire. Ce fût un grand plaisir de travailler avec toi ces dernières années.

Je tiens également à remercier les membres de l'équipe Laplante, qui a été plus qu'une équipe mais une famille d'accueil. En premier lieu, j'adresse mes remerciements à Yves. Je te remercie pour tout le temps que tu as passé à l'apprentissage des techniques, à m'aider pour les protocoles animaux et les journées de sacrifices, et l'analyse des échantillons. Merci pour ta patience, ta bonne humeur, ta gentillesse, ton humour et tes blagues (parfois un peu limite). Mon doctorat n'aurait définitivement pas été le même sans toi!

Je remercie aussi les autres membres de l'équipe Laplante. Blandine, mon amie, merci d'avoir pris le temps de me montrer les expériences et répondre à mes questions malgré ton emploi du temps toujours chargé. Merci de m'avoir accueilli et permis de découvrir le Québec. Merci infiniment pour tous les bons moments passés! Nolwenn, plus qu'un membre du lab mais une amie. Merci pour ton aide, ton soutien et ta bonne humeur, ainsi que tous les instants partagés à l'extérieur. Les Romain, merci pour votre aide au laboratoire, votre énergie, et les bons moments passés. Manal, thank you for your help, as

well as your happiness and your kindness. Audrey, Charles et Laura, merci pour votre aide et votre gentillesse. Je souhaite également à adresser ma gratitude à Laurie, Inès et Soléna qui ont participé à mon projet. Ce fût un plaisir de faire votre rencontre et de travailler avec vous. Je vous souhaite à tous de la réussite pour la suite de votre parcours.

Je tiens également à témoigner ma reconnaissance au Dr. André Marette et son équipe pour leur contribution et leurs conseils. Merci à Trish, Bruno, Kerstin pour votre soutien technique. Merci également à Marie-Josée, à Julie et au staff de l'animalerie, et particulièrement à Audrey Chalifoux pour votre aide.

Je tiens évidemment à remercier ma famille qui m'a supporté tout au long de cette aventure. Maman, j'aimerais un jour être la femme que tu es. Je te remercie de m'avoir toujours soutenu et encouragé tout au long de mes études, et de ma vie. Papa, merci de m'avoir soutenu et encouragé dans mon parcours, et permis de développer un caractère capable d'affronter les défis. Grand frère, Greg, merci infiniment pour tes encouragements, ta présence, ta franchise, et m'avoir donné des coups de pied aux fesses lorsque c'était nécessaire. Tu m'as appris à ne pas baisser les bras, à ne pas tenir compte du jugement des autres, et à croire en moi. Merci à vous trois d'avoir pris soin de moi toutes ces années. Merci Ambre pour ton soutien, ta bonne humeur, ta gentillesse et ton support. Merci à ma filleule, Hanaé, et mon neveu Énaël pour votre joie de vivre, votre énergie, vos sourires et vos rires. Je remercie également mes grands-mères, Maya et Mémé, mes oncles et tantes, cousins et cousines, et plus spécialement : Marie-Claude, Philippe, Benjamin (Ben, tu ne seras bientôt plus le seul Docteur de la famille!), Fanny, Juliette, Sylvie, Gérard, Marraine et tonton Pierre pour votre support et vos encouragements. Merci pour tous ce que vous m'avez donné et m'apportez au quotidien.

Merci également à mes amis de longue date qui m'ont soutenu et accompagné dans cette aventure. Les gars : Alex, Dr. Houzelle, et Arthur merci pour votre soutien moral et toutes les rigolades. Les filles : Marjo, Emilie, Péné et Caro, merci de m'avoir supporté depuis toutes ces années. Malgré la distance qui nous sépare, je ne cesse de penser à vous et des moments inoubliables passés ensemble.

À tous les amis que j'ai rencontrés ici à Québec. Chloé merci infiniment pour ton aide, ton soutien moral et ta gentillesse. Tu as été présente dans les bons moments et ceux plus difficiles. Nico, le docteur en devenir et bientôt Dr. Perrot, merci pour ton support, et les bons moments passés et les fous rires. Dr. Déborah Argaux, Dr. Morgan Gazzola, Nolwenn,

les Romain, Laurent, Gaëtan, toujours un plaisir de partager des soirées, chalets et autres activités ensemble qui ont rendu le doctorat plus agréable. Merci à tous!

Je tiens à adresser un remerciement spécial à Sophie et Olivia, mes colocataires pendant les quatre premières années de mon doctorat. Merci de m'avoir accueilli au Québec et d'avoir fait de votre chez vous, chez moi. Merci Sophie pour ton aide, ton soutien et ta gentillesse. Merci Olivia pour ta bonne humeur, ta gentillesse, tu es une petite fille formidable avec qui j'ai eu un grand plaisir à vivre.

Pour terminer, je souhaite te remercier Gloire pour tout ce que tu m'as apporté. Tu m'as montré une manière plus philosophique d'observer ce monde et les événements de la vie. Tu m'as également rappelé l'importance de relativiser et de prendre du recul face aux difficultés, ainsi que de profiter de chaque instant et des petits plaisirs de la vie. Tu es une rencontre inattendue et spéciale qui restera dans ma mémoire et mon cœur.

## **Avant-propos**

Le présent ouvrage est déposé à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval pour l'obtention du diplôme de Philosophiae Doctor ès Sciences (Ph.D.). Généralement, cette thèse porte sur l'identification de Tsukushi (TSK), une nouvelle hépatokine exprimée et sécrétée en réponse à la stéatose hépatique. La thèse contient une introduction générale rédigée en français portant sur l'obésité et ses pathologies associées, la stéatose hépatique et les mécanismes intervenant dans le développement de la pathologie, et sur les hépatokines impliquées dans la NAFLD. Les chapitres 1 et 2 constituent le corps de l'ouvrage et relatent en détail les travaux de recherche réalisés pour cette thèse. Ces chapitres sont rédigés en anglais sous forme d'articles scientifiques tels qu'ils ont été présentés aux éditeurs en vue de leur publication, selon les exigences éditoriales spécifiques des revues. Finalement, une conclusion termine cette thèse en résumant les principaux résultats obtenus et en discutant des voies futures à explorer susceptibles d'améliorer la compréhension des mécanismes d'action de TSK sur le métabolisme des lipides et son implication dans l'athérosclérose.

## Articles présentés

Les articles qui seront présentés dans cette thèse sont le fruit de mes travaux de de doctorat qui ont été réalisés au cours des cinq dernières années dans le laboratoire du Dr. Mathieu Laplante. Chacune de ces études implique mon entière participation, de la mise en place des protocoles à la rédaction finale des manuscrits. Au cours de mon doctorat, j'ai eu la chance de collaborer à de nombreux projets de recherche en marge de mes propres travaux. Ces collaborations ont conduit à la publication de plusieurs manuscrits. La liste qui suit résume les articles découlant de tous mes travaux et collaborations. Les articles précédés d'un astérisque sont ceux qui seront présentés dans cette thèse.

\***Mouchiroud M**, Camiré É, Aldow M, Caron A, Jubinville É, Turcotte L, Kaci I, Beaulieu MJ, Roy C, Labbé SM, Varin TV, Gélinas Y, Lamothe J, Trottier J, Mitchell PL, Guénard F, Festuccia WT, Joubert P, Rose CF, Karvellas CJ, Barbier O, Morissette MC, Marette A, Laplante M. (2019) The hepatokine TSK does not affect brown fat thermogenic capacity, body weight gain, and glucose homeostasis. *Mol Metab.* 30:184-191.

\***Mouchiroud M**, Camiré É, Aldow M, Caron A, Jubinville É, Turcotte L, Kaci I, Beaulieu MJ, Roy C, Labbé SM, Varin TV, Gélinas Y, Lamothe J, Trottier J, Mitchell PL, Guénard F, Festuccia WT, Joubert P, Rose CF, Karvellas CJ, Barbier O, Morissette MC, Marette A, Laplante M. (2019) The hepatokine Tsukushi is released in response to NAFLD and impacts cholesterol homeostasis. *JCI Insight.* 4(15).

Caron A\*, **Mouchiroud M\***, Gautier N, Labbé SM, Villot R, Turcotte L, Secco B, Lamoureux G, Shum M, Gélinas Y, Marette A, Richard D, Sabatini DM, Laplante M. (2017) Loss of hepatic DEPTOR alters the metabolic transition to fasting. *Mol Metab.* 6(5):447-458. \*Co-auteur, contribution égale.

Labbé SM, **Mouchiroud M**, Caron A, Lamoureux G, Gélinas Y, Freinkman E, Lecomte R, Bossé Y, Festuccia WT, Richard D, Laplante M. (2016) mTORC1 is required for BAT recruitment and metabolic adaptation to cold. *Sci Rep.*, 6:37223.

Caron A, Labbé SM, **Mouchiroud M**, Huard R, Richard D, Laplante M. (2016) DEPTOR in POMC neurons affects liver metabolism but is dispensable for the regulation of energy balance. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 310(11):R1322-31.

Agudelo D, Carter S, Velimirovic M, Durringer A, Rivest JF, Levesque S, Loehr J, **Mouchiroud M**, Cyr D, Waters PJ, Laplante M, Moineau S, Goulet A, Doyon Y. (2020) Versatile and robust genome editing with *Streptococcus thermophilus* CRISPR1-Cas9. *Genome Res.* 30(1):107-117.

# Introduction

## 1 L'obésité

### 1.1 Généralités

L'obésité est aujourd'hui une épidémie mondiale. Son incidence a triplé depuis 1975 et ne cesse d'augmenter chaque année (1,2). En 2016, la proportion de personnes en surpoids ou obèses a atteint 39% de la population mondiale dont 13% des individus sont obèses. L'obésité, définie par un excès de tissu adipeux, est le plus souvent évaluée en clinique par l'indice de masse corporel (IMC). Ce dernier est calculé par le poids en kilogrammes (kg) divisé par la taille en mètres (m) au carré. Un IMC compris entre 25.0 et 29.9 kg/m<sup>2</sup> indique un surpoids alors qu'un IMC supérieur à 30 kg/m<sup>2</sup> indique une obésité plus ou moins sévère. L'obésité est une préoccupation majeure des services de santé puisqu'elle est associée à de nombreuses pathologies telles que le diabète de type 2, la résistance à l'insuline, les maladies cardiovasculaires, les dyslipidémies, l'hypertension, et la stéatose hépatique. Le traitement de l'obésité commence par une évaluation comportementale permettant de déterminer les causes de la prise de poids et ainsi, de pouvoir proposer une stratégie de traitement individualisée. Une modification des habitudes de vie est proposée dans un premier temps. Selon les cas, elle peut être accompagnée de traitement médicamenteux pour augmenter la perte de poids. Cependant les agents pharmacologiques proposés dans ce contexte présentent des contre-indications et certains effets indésirables (3–5). Les interventions chirurgicales représentent des méthodes efficaces pour réduire le poids corporel et améliorer le profil métabolique des individus à long terme (6–8). Cependant, ces procédures sont relativement coûteuses et appliquées exclusivement dans des cas d'obésité morbide. L'obésité représente une problématique majeure et nécessite de nouvelles approches thérapeutiques pour améliorer la santé des individus et diminuer les coûts associés à l'obésité elle-même, mais aussi aux pathologies qui lui sont associées (6,7,9).

### 1.2 Obésité : expansion et dysfonction du tissu adipeux

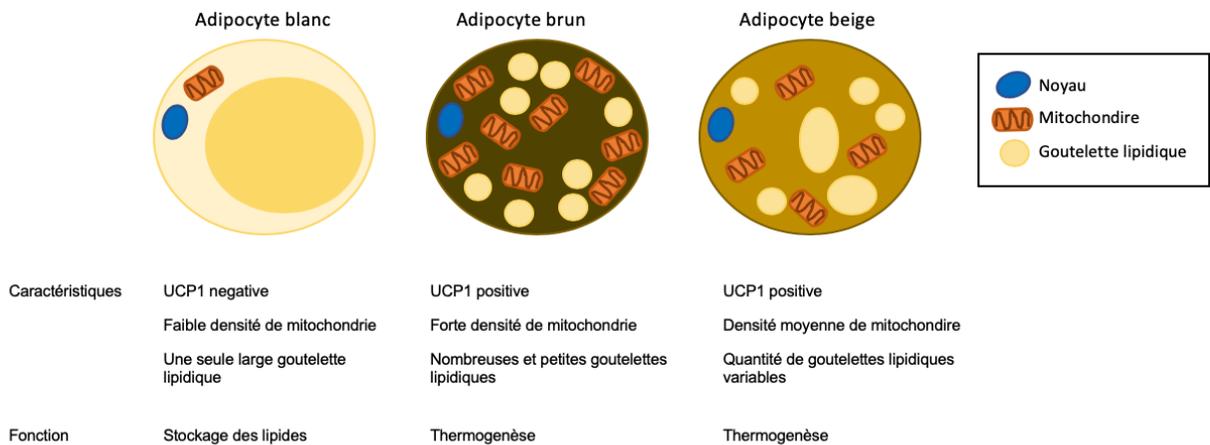
L'obésité se définit par une expansion excessive et/ou anormale du tissu adipeux (TA). Le TA est un tissu essentiel pour le stockage et la libération des acides gras (AG). Il possède également des fonctions immunitaires, endocrines, régénératives, mécaniques et thermiques (10). Les AG, en plus d'être des sources d'énergie, sont aussi impliqués dans

des voies de signalisation leur conférant la capacité d'affecter la fonction cellulaire (11,12). Le TA est réparti en 3 catégories : le tissu adipeux blanc (TAB), le tissu adipeux brun (TABr) et le tissu adipeux beige. Ces tissus se distinguent par des différences histologiques, moléculaires et fonctionnelles. Le TAB est le lieu de stockage de l'énergie et est de loin la forme principale de tissu adipeux chez les mammifères. Le TABr joue quant à lui des rôles importants pour soutenir la thermogénèse. Finalement, le tissu adipeux beige est un hybride entre le TAB et le TABr qui peut autant stocker des lipides que dissiper de l'énergie en réponse à un stimulus adrénérgique.

### 1.2.1 Le tissu adipeux blanc

Le TAB est le tissu adipeux le plus présent et est le lieu de stockage principal de l'énergie. Le TAB est composé d'adipocytes qui ont la capacité de stocker ou libérer les AG en cas d'un excès calorique ou d'un jeûne, respectivement (Figure 1). Le TAB peut être divisé en sous-groupes selon sa localisation mais également selon l'apparition dans le développement, l'histologie, la signature moléculaire et la fonction biologique. On distingue notamment le TA sous-cutané et le TA ectopique. Le TA sous-cutané comprend les dépôts de la partie inférieure incluant la graisse glutéale, sous-cutanée des jambes et intramusculaire, et les dépôts sous-cutanés de la partie supérieure (13). Le TA ectopique correspond à une accumulation de graisse à des sites anatomiques habituellement non-associés au stockage des lipides incluant les organes et la cavité abdominale tels que les dépôts péritonéaux (omentale, mésentérique), rétropéritonéaux (périaortique, périrénale) et périgonadaux. D'autres dépôts adipeux sont présents dans des régions péri-articulaires et assurent une fonction de soutien, de régulation épidermique et hématopoïétique. Du TA est également retrouvé dans la moelle osseuse et dans le muscle (11,14). La distribution de la graisse varie en fonction des individus, du sexe, de l'âge, de l'état de santé global et en réponse aux hormones et aux drogues. Les adipocytes du TA viscéral sont larges et uniloculaires tandis que ceux du TA sous-cutané sont plus petits, plus nombreux et multiloculaires. Le TA viscéral est plus innervé et plus vascularisé. Il contient plus de cellules inflammatoires et est plus sensible à leur infiltration dans un contexte d'obésité. Le TA sous-cutané possède un taux de renouvellement et de formation adipocytaire plus élevé. La Lipoprotéine Lipase (LPL) est plus active dans le TA sous-cutané et sa capacité à hydrolyser les particules riches en triglycérides (TG) et à capter les AG libérés est plus élevée (15,16). La réponse à des stimuli extérieurs est différente entre le TA sous-cutané et viscéral. C'est le cas par exemple avec les hormones. Le TA sous-cutané des hanches-fesses et de la

poitrine est sensible aux œstrogènes qui favorisent l'augmentation de l'adipogénèse de ces dépôts. En revanche, le TA viscéral répond plutôt aux glucocorticoïdes et aux agonistes  $\beta$ -adrénergiques. Ceci explique en partie la différence sexuelle de la distribution des dépôts imagée par les morphologies gynoïde et androïde chez les femmes et les hommes, respectivement (17–19). L'adiposité viscérale est fortement associée à un profil métabolique détérioré et à une augmentation des risques de développer une résistance à l'insuline, du diabète de type 2, de l'hyperlipidémie, de l'hypertension et des maladies cardiovasculaires augmentant ainsi la mortalité/morbidité (11,12,20). Le lien entre l'excès de TA et ces désordres métaboliques sera couvert dans les prochaines sections.



**Figure 1: Adipocytes blanc, brun et beige.**

## 1.2.2 Les tissus adipeux brun et beige

### 1.2.2.1 Le tissu adipeux brun

Chez les mammifères, le TABr est le site principal de production de chaleur, essentielle pour leur survie dans un environnement froid et pour ceux qui hibernent. Les adipocytes du TABr se distinguent du TAB par de plus petites et plus nombreuses gouttelettes lipidiques, ainsi qu'une quantité de mitochondries plus élevée (Figure 1). Ces dernières sont essentielles à la fonction thermogénique du TABr (21). L'oxydation de substrats incluant les lipides, les sucres et les protéines, est couplée à la réduction de coenzymes par la chaîne mitochondriale qui génère de l'énergie sous forme d'un gradient de protons de part et d'autre de la membrane interne mitochondriale (22). Lors de la respiration,

les mitochondries utilisent l'énergie du gradient de protons pour générer de l'adénosine triphosphate (ATP). Il y a alors couplage de la respiration à la synthèse d'ATP. La thermogénèse implique un découplage de la respiration mitochondriale. Le grand nombre de mitochondries dans les adipocytes du TABr permet une oxydation rapide des substrats permettant de libérer de la chaleur en quantité importante. Les adipocytes bruns possèdent une protéine découplante, UCP1 (*uncoupled protein-1*), qui permet le découplage de la respiration et ainsi de brûler des graisses et de produire de la chaleur au lieu de synthétiser de l'ATP (21,23,24). L'expression d'UCP1 est régulée de façon à être fonctionnelle uniquement lorsque la thermogénèse est requise (25).

Le TABr est un tissu plastique qui répond aux stimuli thermogéniques. La stimulation par le froid, régulée par le système nerveux sympathique par la voie  $\beta$ 3 adrénergique, induit une hyperplasie et une hypertrophie des dépôts de TABr ainsi que la différenciation de précurseurs. D'autres facteurs ont la capacité de stimuler le développement du TABr incluant l'Irisine, FGF21 (*Fibroblast Growth Factor 21*), l'orexine, les hormones thyroïdiennes, les peptides natiurétiques et BMP8b (*Bone morphogenetic protein 8b*)(26). La signature génique des adipocytes bruns est caractérisée par l'expression de gènes incluant UCP1, PGC1 $\alpha$  (*Peroxisome Proliferative Activated Receptor Gamma Coactivator 1*), CIDEA (*Cell-death Activator CIDE-A*), PPAR $\alpha$  (*Peroxisome Proliferative Activated Receptor  $\alpha$* ), PRDM16 (*PR domain containing 16*) et DIO2 (*type 2 iodothyronine deiodinase*). Les adipocytes bruns partagent une expression de certains facteurs de transcription commune aux adipocytes blancs tels que PPAR $\gamma$  (*Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- $\gamma$* ) et CEBP (*CCAAT-enhancer-binding proteins*) (21).

Des études chez la souris ont montré une association entre l'activité du TABr et l'obésité (27,28). Plus précisément, les souris obèses génétiquement modifiées (*obob* et *dbdb*) ou soumises à une diète pour développer l'obésité ont une activité de leur TABr diminuée. Dans ce contexte, le TABr apparaît plus blanc et plus gros que lorsqu'il est normalement actif ou lorsqu'il est activé par le froid. De plus, il a été montré que le TABr de souris obèses et hyperglycémiques possède un plus haut niveau d'inflammation, de stress du réticulum endoplasmique (RE), de dommages oxydatifs et une activité augmentée de la respiration mitochondriale (29–31). Longtemps considérés comme inexistant chez l'Homme, les dépôts de TABr ont été observés pour la première fois chez le fœtus et le nouveau-né (32,33). Le développement des techniques d'imagerie ont mis en évidence la présence de dépôts métaboliquement actifs chez l'adulte dans les zones cervicales,

supraclaviculaires, axillaires et paravertébrales. Les dépôts de TABr chez l'humain sont moins nombreux et plus petits que chez les rongeurs. Chez les individus âgés et obèses, les dépôts de TABr sont plus rares alors que chez les personnes travaillant en extérieur, le TABr est plus développé (34–38). Ces observations font du TABr une cible intéressante pour le traitement des désordres métaboliques chez l'Homme (21,23,39).

#### 1.2.2.2 *Le tissu adipeux beige*

La présence de cellules UCP1 positives a été observée dans des dépôts de TAB (40). Ces dépôts adipeux, qui possèdent une capacité thermogénique en réponse à différents stimuli, sont appelés dépôts adipeux beiges. Comme les adipocytes du TABr, les adipocytes beiges présents dans le TAB chez la souris ont plusieurs gouttelettes lipidiques, de nombreuses mitochondries et une signature génique similaire aux adipocytes du TABr (41,42) (Figure 1). Néanmoins, les cellules du beige se distinguent des adipocytes du TABr par leur origine, leur régulation et leur signature génique distincte. Les cellules du beige expriment *Ucp1* en réponse à une activation incluant les agonistes du récepteur  $\beta$ -adrénergique ou *Ppar- $\gamma$*  (21,25).

Chez l'humain la distinction entre le TA blanc et beige n'est pas encore très claire alors que la démarcation est plus franche chez la souris. Le TA beige est l'objet de nombreuses recherches et est une cible potentielle afin d'augmenter la dépense énergétique dans le traitement de l'obésité (21).

## **2 Les pathologies associées à l'obésité**

Dans notre société moderne actuelle, marquée par l'augmentation de la consommation d'aliments riches et de la sédentarité, l'incidence de l'obésité ne cesse d'augmenter accompagnée de ses comorbidités incluant le diabète de type 2, la stéatose hépatique non-alcoolique, les dyslipidémies et les maladies cardiovasculaires (43). Le traitement des comorbidités représente une problématique majeure des services de santé et nécessite de nouvelles approches thérapeutiques pour améliorer la santé des individus et diminuer les coûts associés à l'obésité elle-même et aux pathologies qui lui sont associées.

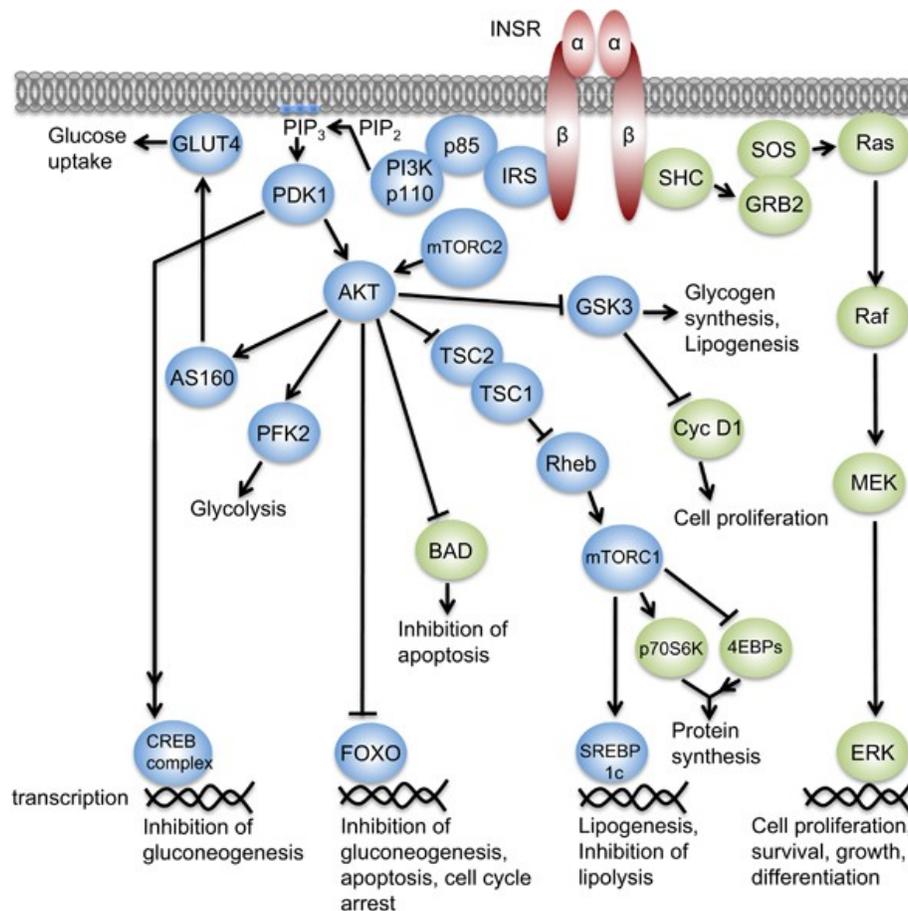
## 2.1 La résistance à l'insuline et le diabète de type 2

L'insuline est une hormone sécrétée par le pancréas. Elle permet l'entrée du glucose dans les cellules où il est utilisé comme source d'énergie ou stocké pour une utilisation future en fonction des besoins de l'organisme et des aliments consommés. Certaines pathologies affectent la production d'insuline comme le diabète de type 1 ou les formes monogéniques (44). Le diabète de type 2 est lui caractérisé par une altération de l'action et/ou de la sécrétion de l'insuline par les cellules  $\beta$ -pancréatiques mais également par la résistance à l'insuline des tissus périphériques incluant le muscle, le foie et le TA. La résistance à l'insuline se définit par la nécessité d'une concentration d'insuline supérieure à l'habitude pour maintenir une glycémie normale. Au niveau cellulaire, la résistance à l'insuline se manifeste par une altération de la signalisation de l'insuline des récepteurs membranaires aux différents substrats en aval. La graisse abdominale est fortement associée au diabète de type 2 (45–51). Dans certains cas, la modification des habitudes de vie permet la rémission du diabète de type 2. Différents éléments peuvent induire la résistance à l'insuline incluant l'augmentation de l'apport calorique, un comportement sédentaire, et d'autres facteurs (pollution environnementale, conditions socioéconomiques et psychosociales, le tabagisme et l'apnée du sommeil) (44).

### 2.1.1 La signalisation normale de l'insuline

Après un repas, le métabolisme du glucose hépatique passe d'un état de production de glucose à son stockage. L'insuline est un élément régulateur essentiel de ce processus. L'insuline se fixe à la sous-unité  $\alpha$  du récepteur de l'insuline ce qui active la tyrosine kinase de la sous-unité  $\beta$  et l'autophosphorylation de ces résidus tyrosine (Tyr-1158, Tyr-1162, et Tyr-1163)(52) (Figure 2). Le récepteur à l'insuline active à son tour PI3K (*phosphatidylinositol 3-kinase*) qui phosphoryle le PIP2 (*phosphatidylinositol 4,5-biphosphate*) pour générer du PIP3 (*phosphatidylinositol (3,4,5)-triphosphate*) (53). Ce dernier active PDK1 (*3-phosphoinositide-dependent kinase 1*) qui phosphoryle AKT et la protéine kinase C (PKC) (54). AKT est un élément essentiel de la réponse à l'insuline et utilise différents substrats incluant mTOR (*mechanistic target of rapamycin*) (55), GSK3 (*glycogen synthase kinase 3*) (56), FOXO (*forkhead box-containing protein, O subfamily*) (57) et AS160 (*AKT substrate of 160kDa*) (58). mTOR est une sérine/thréonine kinase impliquée dans la régulation de la synthèse protéique notamment par la phosphorylation de 4EBP1 (*eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1*) et de la kinase p70 S6 (p70S6K) (59,60). GSK3 est une sérine/thréonine kinase impliquée dans la régulation de la

synthèse de glycogène et plus précisément qui inhibe la glycogène synthase (56). Les facteurs de transcription FOXO, et notamment FOXO1, sont impliqués dans la régulation de gènes contrôlant la gluconéogenèse et l'adipogenèse. En absence de signal de l'insuline, FOXO1 est transporté dans le noyau et stimule l'expression de gènes tels que *Pepck* (*phosphoenolpyruvate carboxykinase*) une enzyme clé de la gluconéogenèse (57), ainsi que la cycline G2, qui est inhibée par l'insuline (61). AS160 est impliqué dans le transport du glucose et notamment l'augmentation des vésicules de stockage du transporteur du glucose GLUT4 (*glucose transporter type 4*) acheminées vers la membrane plasmique, le transport du glucose cellulaire et la synthèse du glycogène (44,58).



**Figure 2: La voie de signalisation de l'insuline. Adapté de (62).**

La liaison de l'insuline à son récepteur provoque l'autophosphorylation de résidus tyrosine. Lors de l'activation, le récepteur de l'insuline recrute différentes protéines adaptatrices et initie une cascade d'événements de phosphorylation. Ces événements de signalisation conduisent finalement à l'activation ou à la répression d'un ensemble de protéines, qui régulent diverses fonctions biologiques.

### 2.1.2 La résistance à l'insuline

La résistance à l'insuline, caractéristique du diabète de type 2, se définit par l'incapacité des cellules à répondre à l'insuline et se manifeste au niveau des tissus dits sensibles à l'insuline incluant le foie, le muscle et le TA. La résistance à l'insuline dans le foie est caractérisée par une altération de la suppression de la production de glucose médiée par l'insuline (63). Cette résistance à l'insuline peut être le résultat de l'activation des protéines PKC- $\epsilon$  et/ou c-JNK1 (*c-Jun N-terminal kinase 1*) résultant en une altération de la phosphorylation du résidu tyrosine d'IRS-1 (*insulin receptor substrate-1*) et IRS-2 par IRTK (*insulin receptor kinase*) (64–66). De plus, la détérioration de la voie de signalisation de l'insuline limite la capacité de l'insuline à activer la glycogène synthase. Les causes de la résistance à l'insuline sont nombreuses et les mécanismes sont multifactoriels. Le plus souvent, elle est déclenchée par des altérations cellulaires comme la lipotoxicité, l'inflammation, la glucotoxicité, la dysfonction mitochondriale ou le stress du réticulum endoplasmique. Dans de plus rares cas, la résistance à l'insuline peut être la conséquence de causes génétiques telles que des mutations du récepteur à l'insuline, des polymorphismes de la protéine IRS1 ou d'AKT et ses cibles (44,67).

#### 2.1.2.1 La lipotoxicité

L'obésité, accompagnée par l'accumulation ectopique d'AG, est associée à la résistance à l'insuline dans le muscle squelettique mais aussi dans le TA et le foie (68). En effet, l'augmentation de la quantité de lipides en circulation et dans les tissus non-adipeux induit de la lipotoxicité. L'accumulation de gras est également responsable de l'augmentation de la gluconéogenèse et ainsi de la production de glucose endogène (22). L'augmentation du transport de lipides dans le cœur et le foie mène à la cardiomyopathie lipotoxique et à la stéatose hépatique non-alcoolique, respectivement (69–71)



Au-delà d'un plus grand flux de lipides, de multiples intermédiaires lipidiques incluant le palmitate, les diacylglycérols (DAG) et les céramides, sont impliqués dans la résistance à l'insuline. L'AG palmitate induit le stress du RE, la production de cytokines et active les sentiers signalétiques JNK et NF- $\kappa$ B (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) (73). Des études ont montré une action de JNK sur la phosphorylation d'IRS-1 sur le résidu Ser-307, associé à une altération de la signalisation de l'insuline (74,75). Cependant, d'autres études n'observent pas ces effets mais plutôt une implication de mécanismes indirects suspectés d'altérer la lipogénèse participant à la résistance à l'insuline (76–79).

Les DAG ont été montrés pour induire la résistance à l'insuline par l'activation des voies PKC et plus précisément l'isoforme PKC- $\theta$  dans le muscle (80,81) et PKC- $\epsilon$  dans le foie. Une fois activé, PKC phosphoryle directement les résidus sérine des substrats du récepteur de l'insuline et plus particulièrement IRS-1. Ceci résulte en la diminution de la phosphorylation du résidu tyrosine d'IRS-1, réduisant la signalisation en aval vers le métabolisme du glucose via la voie PI3K/Akt, et finalement une dégradation accrue d'IRS-1 (82,83). Dans le foie, les DAG activent l'isoforme PKC- $\epsilon$  qui phosphoryle le récepteur de l'insuline au site Thr1160 (84), résultant en l'inhibition de l'activité tyrosine kinase du récepteur de l'insuline (Figure 3 a.). Ce mécanisme peut par la suite affecter la signalisation de l'insuline dans le foie incluant la synthèse de glycogène, la lipogénèse *de novo* et gluconéogenèse (66,72). Une réduction de la quantité de DAG dans le muscle squelettique et le foie protège les souris contre la résistance à l'insuline induite par une diète riche en gras (85). Des études humaines ont révélé que les DAG contribuent à la résistance à l'insuline hépatique notamment par l'activation de PKC- $\epsilon$  qui va réguler négativement la signalisation de l'insuline (86–88).

Des études ont montré une implication des céramides dans l'induction de la résistance à l'insuline en activant les voies PKC et JNK (80,81). Les mécanismes impliqués dans l'action des céramides sur la résistance à l'insuline ne sont pas clairs. Des études *in vitro* ont révélé deux mécanismes directs potentiels (89–91). Dans le premier, l'activation de PKC $\zeta$  par les céramides altère la translocation d'AKT à la membrane plasmique, prévenant l'implication d'AKT dans l'action de l'insuline (92) (Figure 3 b.). Dans le deuxième, l'activation de PP2A (*protein phosphatase 2A*), une protéine qui assure la majorité de l'activité phosphatase dans les cellules, par les céramides mène à la phosphorylation et à l'inactivation d'AKT (91,93). Dans des modèles animaux d'obésité, la présence de

céramides dans le foie et le muscle est associée à la résistance à l'insuline par l'intermédiaire d'une interaction avec AKT (65). De plus, PKC peut agir en amont d'autres serine/thréonine kinases (94,95). Ainsi, l'activation de PKC peut augmenter la capacité des kinases, telles que JNK et IKK- $\beta$  (*Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit beta*), à phosphoryler IRS-1 sur le résidu Ser-307 (96). Chez l'humain, l'implication des céramides dans la résistance à l'insuline dans le foie est controversée (86–88). Des études complémentaires sont nécessaires pour confirmer leur participation dans la résistance à l'insuline dans le foie.

#### 2.1.2.2 Inflammation

Dans un contexte d'obésité, l'apparition d'une inflammation de faible grade est fortement associée à la résistance à l'insuline. En effet chez les patients obèses, le TA est infiltré de cellules immunitaires responsables d'une réponse proinflammatoire. En effet, les adipocytes et les macrophages sécrètent des cytokines proinflammatoires incluant TNF- $\alpha$  (*tumor necrosis factor  $\alpha$* ), IL-1 $\beta$  (*interleukin-1 $\beta$* ), ou IL-6 (*interleukin-6*) (64,97,98). Ces dernières induisent la résistance à l'insuline dans les adipocytes par l'activation des sérine/thréonine kinases qui réduisent l'expression d'IRS-1, GLUT4 et PPAR $\gamma$  (99,100), ou l'activation de SOCS3 (*suppressor of cytokine signaling 3*), un régulateur négatif de la voie de l'insuline (101). De plus, la sécrétion de la chimiokine MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein-1*) par les adipocytes induit l'accumulation de macrophages dans le TA qui est également associé à la résistance à l'insuline (102). Chez les rongeurs, la diète riche en gras et l'obésité activent NF- $\kappa$ B responsable de l'apparition d'inflammation accompagnée d'une augmentation des interleukines IL-6, IL-1 $\beta$  et TNF- $\alpha$  ayant pour conséquence une résistance à l'insuline dans le muscle squelettique et le foie (103). Il existe une corrélation entre les niveaux d'expression de *Tnf- $\alpha$*  dans le TA et l'hyperinsulinémie, un marqueur indirect de la résistance à l'insuline (67).

L'inflammation associée à l'obésité peut également être induite par l'activation de la voie des TLR (*toll-like receptor*) et plus précisément des TLR-2 et -4. Cette voie est induite dans l'immunité acquise généralement activée par des motifs moléculaires associés à des endotoxines produites par des bactéries à Gram négatif tels que le LPS (lipopolysaccharide) et induit l'inflammation par la voie NF- $\kappa$ B (104). TLR-4 est particulièrement élevé en contexte d'obésité dans le muscle squelettique et le TA (73,105). D'autre part, les AG saturés sont

capables d'activer la voie du TLR indiquant un rôle potentiel de ces récepteurs dans l'inflammation associée à l'obésité (44,73,106).

#### 2.1.2.3 *Glucotoxicité*

Le glucose, lorsque présent à des concentrations supérieures à celles physiologiques, peut altérer la sensibilité à l'insuline dans le muscle et le TA, et diminuer la sécrétion d'insuline des cellules  $\beta$ -pancréatiques (107). Une hyperglycémie peut être induite par une diminution du transport du glucose dans le muscle squelettique et peut altérer l'action de l'insuline dans le TA et le foie (108). L'hyperglycémie peut également activer la voie JNK et induire la résistance à l'insuline dans le TA, le muscle squelettique, le foie et le pancréas (64). Finalement, l'hyperglycémie peut induire la synthèse *de novo* de DAG et donc activer la voie PKC et ainsi causer de la résistance à l'insuline comme mentionné précédemment (109,110).

#### 2.1.2.4 *Dysfonction mitochondriale*

La dysfonction des mitochondries est responsable de la formation d'espèces réactives à l'oxygène (ERO). À de faibles niveaux, les ERO peuvent améliorer l'action de l'insuline (111). Cependant, à de hautes concentrations elles peuvent induire un stress oxydatif. Une augmentation de ce dernier induit l'activation de kinases de stress qui, à leur tour, induisent la résistance à l'insuline via la phosphorylation de sérine, Ser-307 et Ser-362, des protéines IRS (112,113). La présence anormalement élevée de ERO a été observée chez les patients obèses et diabétiques. L'augmentation de ERO peut être expliquée par une augmentation du flux de métabolites dans la mitochondrie, une altération des protéines de la mitochondrie et une réduction de l'expression d'enzymes antioxydantes (112,114,115). De plus, la résistance à l'insuline peut être induite par une altération de la dynamique mitochondriale tels que la fission mitochondriale ou une déficience de l'oxydation mitochondriale des AG dans le foie résultant en l'accumulation de DAG (44,116).

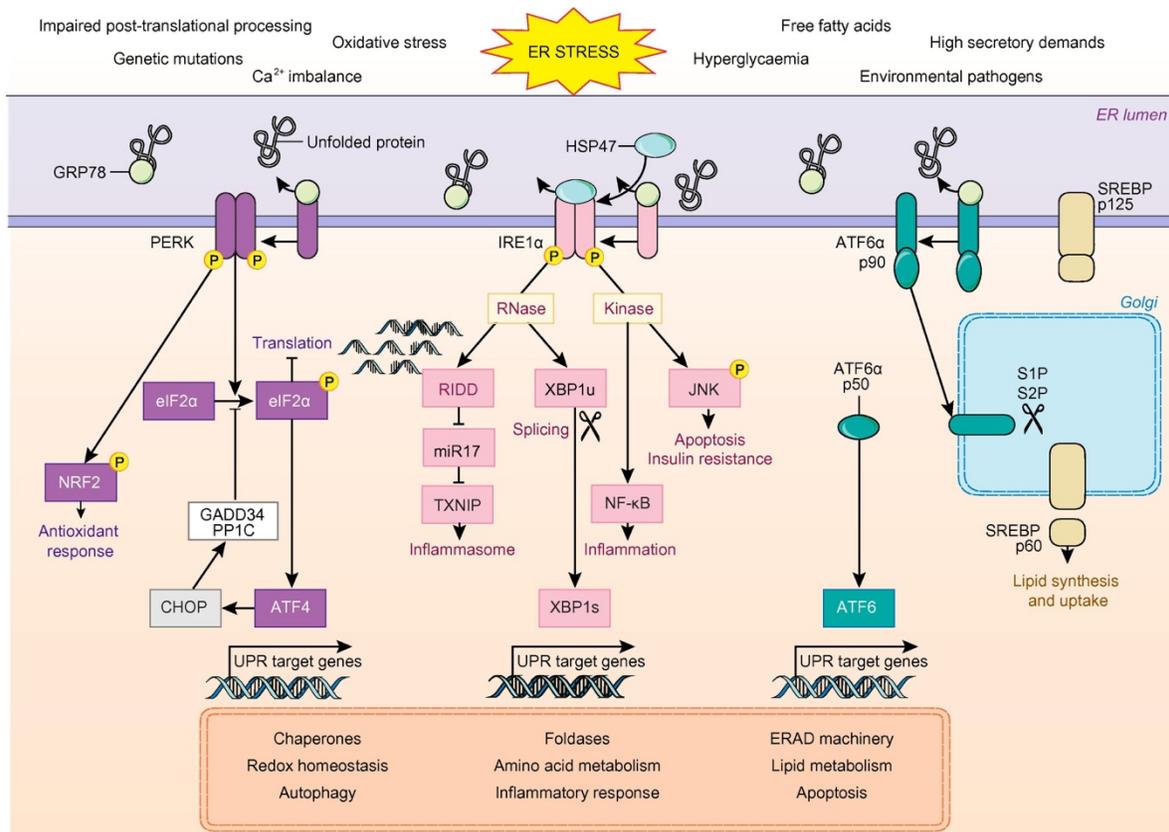
#### 2.1.2.5 *Le stress du réticulum endoplasmique*

Le RE est une organelle intracellulaire impliquée dans la synthèse, le repliement, le transport et la maturation des protéines. Il a également un rôle dans la synthèse des TG et du cholestérol, le métabolisme des drogues et le stockage/relargage du calcium. En conditions normales, un état d'homéostasie est maintenu entre la quantité de protéines non repliées et la capacité de repliement du RE (117). La réponse UPR (*unfolded protein response*) est une réponse au stress du RE pour assurer le repliement correct des protéines,

la maturation et le contrôle qualité du RE, et ainsi de maintenir le RE et la cellule dans un état d'équilibre en produisant plus de protéines chaperonnes afin d'augmenter la capacité de repliement du RE (118). La réponse UPR est constituée de trois branches caractérisées par des récepteurs membranaires du RE : PERK (*protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase*), IRE1 $\alpha$  (*inositol requiring enzyme-1 $\alpha$* ) et ATF6 (*activating transcription factor-6*). GPR78 (*glucose regulated protein 78* ou BIP), une protéine chaperonne majeure, est liée à ces récepteurs et sa libération induit leur activation par dimérisation et autophosphorylation (119,120). PERK inhibe la synthèse protéique générale par la phosphorylation de eIF2 $\alpha$  (*eukaryotic translation initiation factor-2 $\alpha$  subunit*) qui augmente la transcription de certains gènes cibles de la réponse UPR dont ATF4 (*activating transcription factor 4*) (121,122). IRE1 $\alpha$  dégrade l'acide ribonucléique messager (ARNm) permettant de réduire le flux entrant de protéines dans le RE. IRE1 $\alpha$  est également responsable de l'épissage alternatif de l'ARNm de XBP1 (*X-box-binding protein 1*) qui induit la transcription d'éléments de la réponse UPR impliqués dans l'homéostasie (123,124). ATF6 transite jusqu'au Golgi où il est clivé. Sa forme clivée induit la transcription de nombreux facteurs de la réponse UPR dont XBP1, CHOP (*C/EBP homologous protein*) et ATF4 (125,126) (Figure 4).

Les données acquises dans diverses études chez la souris et l'Homme montrent que la réponse UPR fonctionne comme une réponse cellulaire pour balancer les besoins de la cellule (127–131). Des éléments de la réponse UPR régulent la lipogenèse, la formation des gouttelettes lipidiques et le stockage des lipides. Des évidences suggèrent que la réponse UPR est également impliquée dans la régulation du métabolisme du glucose (132,133). Ainsi, l'activation de la réponse UPR altère l'équilibre lipidique de la cellule, puis par l'accumulation d'intermédiaires lipidiques dérègle la signalisation de l'insuline. Les 3 branches de la réponse UPR sont activées en contexte d'obésité et agissent ensemble pour réduire la proportion de protéines mal repliées (134). En condition physiologique, les cellules  $\beta$ -pancréatiques produisent une quantité importante d'insuline. En revanche, dans un contexte de résistance à l'insuline, les cellules  $\beta$ -pancréatiques prolifèrent et sécrètent une plus grande quantité d'insuline (135). Face à une demande constante d'insuline en contexte d'obésité et de résistance à l'insuline, eIF2 $\alpha$  est activé via PERK atténuant la traduction des protéines afin de réduire la charge du RE en prévenant la synthèse de nouvelles protéines pour réduire leur accumulation dans le RE (122,135,136). Malgré la mise en place de ce mécanisme, la capacité des cellules à gérer la maturation des protéines peut être dépassée.

Dans ce contexte, les protéines mal repliées s'accumulent et induisent un stress du RE chronique (136). Lors d'une activation prolongée de la réponse UPR, la production chronique d'ATF6 peut réguler négativement la production d'insuline en supprimant la transcription du gène de la proinsuline (137–140). La voie IRE1 $\alpha$  peut également être activée et induire l'apoptose via ASK1 (*apoptosis signal-regulating kinase-1*) (141).



**Figure 4: La cascade de signalisation de la réponse UPR. Adapté de (142).**

De multiples stimuli endogènes et exogènes peuvent créer un stress du RE conduisant à l'accumulation de protéines mal repliées et à l'activation ultérieure de la réponse UPR. GRP78 se dissocie des trois capteurs transmembranaires du RE : PERK, IRE1 $\alpha$  et ATF6 qui activent leurs cascades de signalisation respectives pour rétablir d'abord la protéostase et favoriser la survie cellulaire par la transcription des gènes cibles. PERK phosphoryle eIF2 $\alpha$  qui inhibe la traduction pour réduire la charge protéique du RE, mais augmente l'expression du facteur de transcription ATF4. IRE1 $\alpha$  est impliqué dans la dégradation des ARNm et de l'épissage de XBP1 entraînant l'activation du puissant facteur de transcription XBP1s. ATF6 est transporté de l'ER vers le Golgi pour être clivé, libérant ainsi le facteur de transcription cytosolique ATF6.

La réponse au stress du RE est également proposée pour jouer un rôle dans l'accumulation de lipides et dans la résistance à l'insuline hépatique (125). Dans le foie, le stress du RE contribue à la résistance à l'insuline par l'activation de facteurs de transcription

qui régulent l'expression de gènes gluconogéniques. Par exemple, le stress du RE active CREBH (*cyclic adenosine monophosphate (c-AMP)-responsive element-binding protein H*), un homologue d'ATF6 plutôt spécifique du foie, qui augmente l'expression de gènes impliqués dans la gluconogénèse incluant PEPCK et G6Pase (glucose-6-phosphatase), et de marqueurs inflammatoires. En revanche, l'activation de XBP1 induit la dégradation de FOXO1 réduisant la gluconogénèse (143). Chez la souris, la surexpression de XBP1 épissé réduit la réponse du stress du RE, diminue l'activation de JNK et augmente la signalisation de l'insuline en diminuant la phosphorylation de la sérine 307 d'IRS-1 (144). De plus, la résistance à l'insuline induite par le stress du RE peut également augmenter la lipogénèse en augmentant l'accumulation de DAG et de céramides par l'activation de PERK et elf2 $\alpha$  (143). L'activation de la réponse UPR est également associée à une augmentation de l'expression de TRB3 (*tribbles-related protein 3*), un gène fortement associé à la résistance à l'insuline (145). Une augmentation de son expression est observée chez les souris diabétiques et chez les patients obèses (125,126,135).

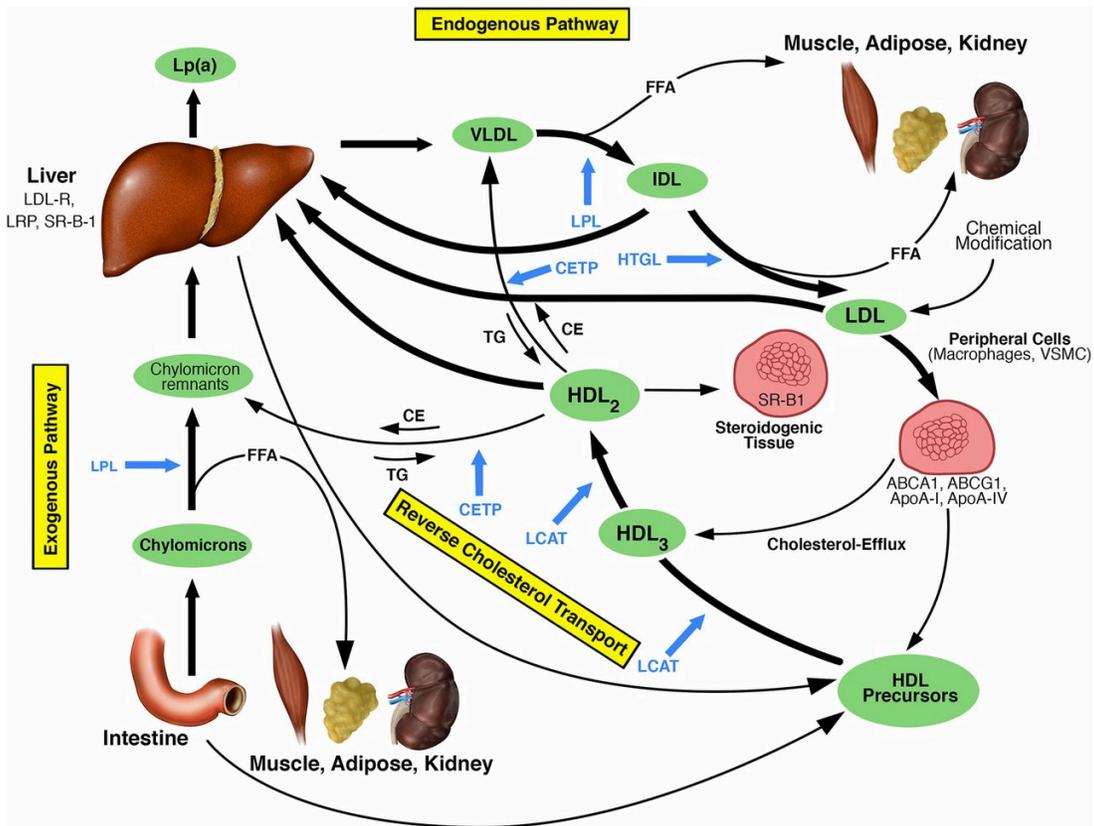
Dans le TA, les souris obèses présentent une activité augmentée de PERK et IRE $\alpha$ . Chez l'humain, des études ont révélé une augmentation de l'activation d'IRE1 $\alpha$  JNK, et de l'expression de XBP1 dans le TA des individus obèses (146). De plus, les AG non-estérifiés libérés par le TA viscéral activent PERK qui augmente l'expression de cytokines incluant TNF $\alpha$  et IL-6, maintenant le stress du RE et participant à la résistance à l'insuline (147–149). Dans le TA et le muscle squelettique, IRE1 $\alpha$  active JNK et IKK $\beta$  induisent la phosphorylation d'IRS-1 sur le résidu Ser-307 qui est associé à une altération de la signalisation de l'insuline (144,150–154).

## **2.2 Les dyslipidémies**

### **2.2.1 Les lipoprotéines**

Les lipoprotéines sont des complexes macromoléculaires qui transportent divers lipides et protéines dans le plasma. Les molécules de TG et d'esters de cholestérol hydrophobes composent le noyau des lipoprotéines. Elles sont enveloppées par une monocouche lipidique composée de phospholipides, de cholestérol libre et de protéines (155). Ces protéines sont nommées apolipoprotéines et sont des régulateurs importants du transport des lipides. En effet, les apolipoprotéines activent/inhibent des enzymes plasmatiques et servent de ligands des récepteurs membranaires (156). Les lipoprotéines sont divisées en plusieurs sous-groupes selon leur densité. Les lipoprotéines de basse

densité (LDL, *low-density lipoprotein*) transportent le cholestérol, ainsi que des TG et des vitamines liposolubles, du lieu de sécrétion vers les tissus périphériques (Figure 5). Les cellules de ces tissus nécessitant du cholestérol expriment à leur surface des récepteurs spécifiques aux LDL incluant LDLR (*low-density lipoprotein receptor*) et LRP1 (*low density lipoprotein receptor-related protein 1*). Les LDL possèdent l'Apolipoprotéine B-100 (ApoB-100) (155,157,158). Les lipoprotéines de haute densité (HDL, *high-density lipoprotein*) récupèrent le cholestérol oxydé des artères et des tissus extra-hépatiques pour les ramener au foie où il est dégradé. Il s'agit du transport inverse du cholestérol (159,160). Les HDL possèdent à leur surface l'apolipoprotéine A (ApoA), et plus précisément l'ApoA1 (161,162), l'apolipoprotéine C (ApoC), l'apolipoprotéine D (ApoD), et l'apolipoprotéine E (ApoE) (155,163,164). Les chylomicrons sont des lipoprotéines qui assurent le transport des lipides de l'intestin, provenant de l'alimentation, vers les autres tissus. Ce phénomène caractérise la voie exogène du métabolisme des lipoprotéines (155). Les chylomicrons possèdent à leur surface l'ApoA, l'ApoB-48, l'ApoC, et l'ApoE (155,165). Les lipoprotéines de très basse densité (VLDL, *very low-density lipoprotein*) transportent le cholestérol synthétisé par le foie vers les tissus périphériques, et caractérisent la voie endogène du métabolisme des lipoprotéines. L'ApoB-100, l'ApoC et l'ApoE sont présentes sur les VLDL (155,165). Les lipoprotéines de densité intermédiaire (IDL, *intermediate density lipoprotein*) sont des particules VLDL ayant perdu leur ApoC. Les IDL ont à leur surface l'ApoB-100 et l'ApoE (155,165). Enfin, la lipoprotéine(a) (Lp(a)) est prise en compte pour évaluer le risque vasculaire. Cette dernière a une forte capacité de liaison à la paroi artérielle. Des hauts niveaux de Lp(a) sont associés à une augmentation du risque d'athérosclérose (69,156,166). L'apolipoprotéine (a) se trouve à la surface de la Lp(a). Il existe également d'autres apolipoprotéines retrouvées à la surface de plusieurs lipoprotéines (156).



**Figure 5: Schéma du métabolisme des lipoprotéines. Adapté de (167).**

Les flèches bleues se réfèrent aux points d'action des enzymes respectives en bleu. ABCA1, transporteur de cassette de liaison à l'ATP A1; ABCG1, transporteur de cassette de liaison à l'ATP G1; ApoA-I, apolipoprotéine A-I; ApoA-IV, apolipoprotéine A-IV; CE, ester de cholestérol; CETP, protéine de transfert des esters de cholestérol; FFA, acide gras libre; HTGL, lipase triglycéride hépatique; IDL, lipoprotéine de densité intermédiaire; LCAT, lécithine – cholestérol acyltransférase; LDL-R, récepteur LDL; LPL, lipoprotéine lipase; LRP, protéine apparentée à LDL-R; SR-B1, récepteur piègeur B1; TG, triglycéride; VLDL, lipoprotéine de très basse densité; VSMC, cellules musculaires lisses vasculaires.

### 2.2.2 Les caractéristiques de la dyslipidémie

La résistance à l'insuline est le désordre métabolique le plus commun dans l'obésité et est un facteur prédominant dans le développement de la dyslipidémie. Le terme de « dyslipidémie métabolique » est employé pour une forme de dyslipidémie induite par la combinaison de l'obésité et de la résistance à l'insuline. Ses principales caractéristiques sont des niveaux élevés de TG, des niveaux faibles de cholestérol de HDL, des niveaux normaux de cholestérol total et LDL, mais une plus grande quantité de particules LDL plus petites et plus denses (168,169).

Dans un contexte d'hypertriglycéridémie et d'un niveau faible de cholestérol LDL, les lipoprotéines circulantes subissent un remodelage par des enzymes telles que la protéine

de transfert d'ester de cholestérol (CETP) et la triglycéride lipase hépatique (LIPC). L'échange de lipides par CETP est fortement influencé par la proportion de lipoprotéines donneuses de TG (170,171). L'hypertriglycéridémie augmente la quantité de particules VLDL larges qui promeut le transfert de molécules de TG sur les particules LDL et HDL en échange de molécules d'ester de cholestérol (172–174). Chez les personnes avec une obésité viscérale, les particules LDL et HDL enrichies en TG deviennent de bons substrats de la LIPC menant à la déplétion du noyau lipidique de ces particules, et résultant en la formation de particules LDL et HDL petites et denses (175). Les particules HDL de petites tailles sont plus sensibles à la dégradation et à l'augmentation de la clairance dans le sang à cause de leur noyau réduit en ester de cholestérol. Les niveaux de particules HDL sont ainsi souvent plus faible chez les individus souffrant d'obésité viscérale (171,176).

### 2.2.3 L'athérosclérose

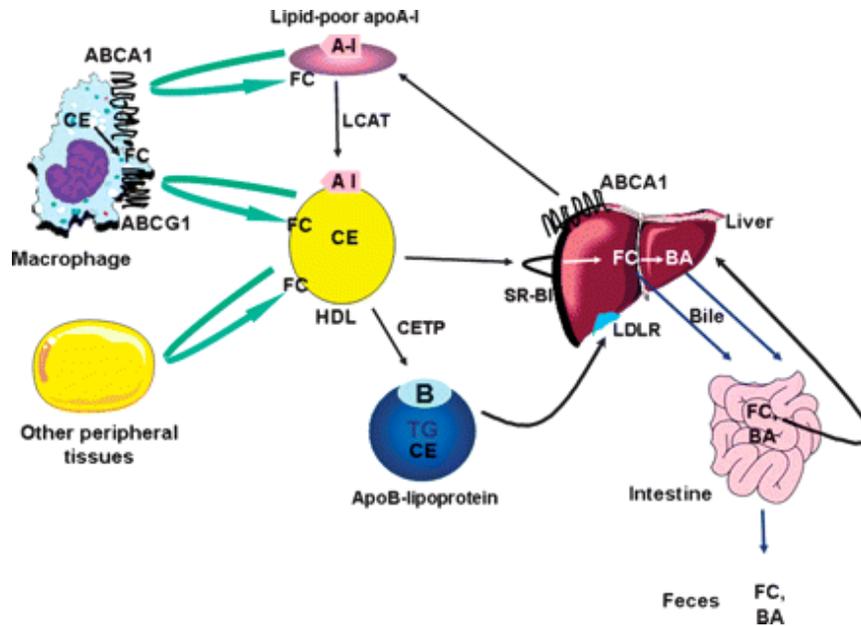
La dyslipidémie athérogène est associée à l'athérosclérose, une pathologie caractérisée par la formation de plaques d'athérome dans les artères et responsable de maladies cardiovasculaires. Les petites particules LDL caractérisant la dyslipidémie se lient moins efficacement aux récepteurs LDL, la voie de dégradation de ces dernières. Ainsi, le nombre de petites particules LDL augmente et ces dernières restent plus longtemps en circulation (177). Lorsqu'une particule de LDL se lie au récepteur LDL, ces derniers sont internalisés et dégradés dans le lysosome. Le récepteur LDL est ensuite recyclé au niveau de la membrane cellulaire. La proprotéine convertase subtilisine / kexine de type 9 (PCSK9) est une sérine protéase qui se lie au récepteur LDLR et médie son internalisation et sa dégradation dans le lysosome (178). PCSK9 réduit le recyclage du LDLR et ainsi diminue la captation des particules LDL et donc l'élimination de ces dernières du plasma (179,180). PCSK9 est également impliquée dans la régulation de l'absorption hépatique des lipoprotéines ApoB situées aussi sur les VLDL et les chylomicrons (181). PCSK9 est une cible thérapeutique intéressante pour réduire les concentrations plasmatiques de LDL, d'ApoB et éventuellement de l'athérosclérose (182,183). D'autre part, la résistance à l'insuline diminue la clairance des LDL en diminuant la capacité de l'insuline à stimuler l'expression des récepteurs LDL. Ainsi, les petites particules LDL se fixent aux parois des artères (184–187). De plus, la conformation des ApoB à la surface des petites particules LDL est modifiée ce qui augmente les interactions avec les cellules endothéliales des artères (188,189). Les particules étant plus nombreuses et plus petites, leur entrée dans la paroi vasculaire est facilitée. Les macrophages résidents reconnaissent les particules LDL

via leurs récepteurs et les internalisent, favorisant la formation de cellules spumeuses, la première étape vers le développement de plaques d'athérome (190–193). Ces plaques diminuent ou bloquent le flux sanguin. Dans certains cas, la plaque d'athérome peut se rompre résultant en la formation d'un caillot sanguin qui bloque alors la circulation sanguine au lieu de rupture, ou qui se déplace et obstrue la circulation vers les organes. Selon les artères touchées et le stade, l'athérosclérose peut être à l'origine de plusieurs problèmes de santé dont la crise cardiaque et l'accident vasculaire cérébral (166,194,195).

#### 2.2.4 L'efflux de cholestérol

Le cholestérol est un composant de la membrane cellulaire qui participe à sa structure mais aussi à la modification de sa rigidité et fluidité. Le cholestérol est également un précurseur pour la biosynthèse de vitamine D, d'hormones stéroïdiennes (cortisol, aldostérone et androgène), d'hormones sexuelles (testostérone, œstrogène et progestérone) et d'acides biliaires. Le cholestérol est impliqué dans de nombreux processus biologiques et est requis pour l'homéostasie cellulaire. En revanche, des niveaux élevés de cholestérol peuvent être responsable de dérèglement métabolique. La plupart des tissus périphériques n'expriment pas de voies pour cataboliser le cholestérol. Ainsi, l'efflux de cholestérol est essentiel pour maintenir l'homéostasie. L'accumulation de cholestérol, comme par exemple dans les cellules spumeuses de la paroi artérielle, est responsable du développement de plaque d'athérome (196). Les particules HDL, des accepteurs de cholestérol, assurent la fonction de transport inverse de cholestérol. Les particules HDL sont composées d'un noyau de molécules d'ester de cholestérol et de TG stabilisés par une couche de phospholipides et d'ApoA1, le principal composant de ces particules (197,198). La présence de phospholipides permet la solubilisation des particules HDL et le transport de cholestérol libre non-estérifié relâché par les cellules. Les particules HDL sont prédites comme antiathérogènes puisqu'elles favorisent l'efflux de cholestérol des tissus périphériques, incluant les parois artérielles, vers le foie pour être métabolisé et excréte dans la bile ou être métabolisé et excréte directement ou après transformation en acides biliaires dans la bile (199). Les particules HDL préviennent les modifications chimiques des particules LDL dans les parois artérielles et ainsi réduisent leur captation par les macrophages. De plus, les particules HDL empêchent le recrutement des précurseurs des macrophages réduisant le nombre de cellules accumulant des lipides. Il a également été montré que les particules HDL transportent des molécules avec des propriétés anti-inflammatoires, anti-thrombotiques et anti-oxydantes. Des études ont montré une

association entre des niveaux élevés d'HDL et une diminution des maladies cardiovasculaires (MCV) (197,200,201).



**Figure 6: Transport de cholestérol inverse. Adapté de (202).**

Le foie sécrète l'ApoA1 qui acquiert rapidement du cholestérol via le transporteur des hépatocytes ABCA1. L'ApoA1 favorise également l'efflux de cholestérol des macrophages via ABCA1. Les HDL matures sont formés par l'action de LCAT et favorise l'efflux de cholestérol des macrophages via le transporteur ABCG1, ainsi que d'autres tissus périphériques. Les HDL matures peuvent transférer leur cholestérol vers le foie directement via SR-BI ou indirectement via un transfert médié par CETP vers des lipoprotéines contenant de l'ApoB, avec une absorption ultérieure par le foie via le récepteur LDLR. Le cholestérol hépatique peut être excrété dans la bile directement sous forme de cholestérol ou après conversion en acides biliaires et à moins qu'il ne soit réabsorbé par l'intestin, il est finalement excrété dans les fèces.

La première étape du transport inverse de cholestérol est l'efflux de cholestérol libre de la membrane plasmique cellulaire aux particules HDL (202) (Figure 6). Dans le cas des macrophages, quatre voies d'efflux ont été identifiées. Il y a deux voies passives incluant la diffusion simple (voie de diffusion aqueuse) et la diffusion facilitée (voie médiée par SRB-I). Les deux autres voies sont actives et incluent les membres de la famille de cassettes de liaison ATP (ABC) des transporteurs membranaires, ABCA1 (*ATP-binding cassette A1*) et ABCG1 (*ATP binding cassette subfamily G member 1*). Une étude réalisée avec des macrophages péritonéaux de souris chargés de cholestérol incubés avec du sérum humain dilué a révélé que les deux tiers de l'efflux de cholestérol est effectué par les voies actives et majoritairement par la voie ABCA1 (203). La diffusion aqueuse est la voie passive

principale et compte environ 30% de l'efflux total. À noter que dans les macrophages péritonéaux de souris normales environ 80% de l'efflux total se fait par cette voie. Les voies actives ABCA1 et ABCG1 jouent un rôle clé de l'homéostasie du cholestérol cellulaire. Chez la souris, l'absence des deux transporteurs entraîne l'accumulation de cellules spumeuses et une athérosclérose accélérée (201,204). Dernièrement, l'association entre les niveaux d'HDL sanguins et le risque de MCV est remise en question puisque les mesures de cholestérol HDL ne reflètent pas l'abondance globale des particules HDL, la distribution des sous-espèces HDL, ou la capacité du transport du cholestérol inverse. Des études semblent indiquer une importance de la fonctionnalité des HDL dans l'association avec les MCV plutôt que leur taux (205).

D'autre part, le cholestérol peut être converti en acides biliaires dans le foie qui sont ensuite sécrétés dans la bile. Environ 95% des acides biliaires et jusqu'à 80% du cholestérol de l'intestin sont réabsorbés dans la lumière intestinale par les récepteurs ABST (*apical sodium bile acid transporter*) et NCP1L1 (*Nieman-Pick C1-Like 1*), respectivement (206,207). En 1967, Simmonds et al. ont mis en évidence que le cholestérol était absorbé mais également sécrété par l'intestin (208) induisant son excrétion dans les fèces. La sécrétion intestinale de cholestérol est nommée excrétion trans-intestinal de cholestérol (TICE) et se déroule en quatre étapes : (1) l'assimilation du cholestérol, sous forme de LDL et/ou VLDL principalement, par la membrane basolatérale de l'entérocyte; (2) la translocation du cholestérol du côté basal au côté apical de l'entérocyte; (3) l'excrétion par la membrane apicale dans la lumière intestinale via les récepteurs ABCG5 et ABCG8 (*ATP binding cassette G5 and G8*); (4) la réabsorption partielle du cholestérol sécrété par NPC1L1 suivi de la translocation (209,210). Les mécanismes moléculaires impliqués dans le TICE ne sont pas encore bien compris.

### **2.3 Les maladies cardiovasculaires**

L'obésité augmente considérablement les risques de développer une MCV incluant les maladies coronariennes, l'insuffisance cardiaque, l'hypertension, les maladies cérébrovasculaires, la fibrillation auriculaire, les arythmies ventriculaires et les morts subites cardiaques. L'obésité a également été associée à l'apnée obstructive du sommeil et à d'autres syndromes d'hypoventilation, qui affectent négativement la fonction cardiovasculaire (211). L'obésité augmente la morbidité et la mortalité des MCV de façon directe ou indirecte. Les effets directs se manifestent par les adaptations structurelles et fonctionnelles du système cardiovasculaire en réponse à l'obésité, ainsi que par l'action des

adipokines sur l'inflammation et l'homéostasie vasculaire menant à un environnement pro-inflammatoire et pro-thrombotique. Les effets indirects sont liés à la présence de plusieurs facteurs de risque des MCV incluant la résistance à l'insuline, le diabète de type 2, l'adiposité viscérale, l'hypertension et la dyslipidémie (211).

Le TA, et notamment le TA viscéral, est associé aux risques cardiométaboliques. Le TA a la capacité de réguler le devenir des lipides en excès. Il est donc impliqué dans le maintien de l'homéostasie métabolique, ou dans l'apparition d'une inflammation de faible grade accompagnée de résistance à l'insuline avec des conséquences sur le cardiométabolisme (20). D'autre part, le TA communique avec d'autres tissus incluant le cerveau, le foie, le muscle squelettique, le cœur et les vaisseaux sanguins (212). Ainsi, une expansion excessive et anormale du TA peut avoir des répercussions à la fois locales et systémiques qui favorisent le développement de pathologies cardiaques. Les conséquences locales sont une inflammation locale (213), de l'hypoxie (214), de la fibrose (215), une sécrétion altérée d'adipokines (216) et une dysfonction mitochondriale (217). Les conséquences systémiques sont la résistance à l'insuline, l'altération du métabolisme du glucose et des lipides, l'hypertension, un état pro-inflammatoire et pro-thrombotique, et une dysfonction endothéliale. Tous ces dérèglements contribuent à lier l'obésité et les MCV (211,218).

#### **2.4 Les autres comorbidités de l'obésité**

L'obésité est associée à d'autres comorbidités incluant l'hypertension, l'apnée du sommeil et certains cancers (43,211). L'hypertension est un facteur de risque important pour de nombreuses MCV mais est également responsable de dommages au niveau du système nerveux central et des reins. La présence d'autres facteurs de risque tels que la résistance à l'insuline et le syndrome métabolique augmente les effets délétères de l'hypertension sur les risques de MCV (20). L'association entre l'obésité et l'apnée du sommeil est reconnue depuis de nombreuses années. L'augmentation du TA viscéral ainsi que du TA au niveau du cou peut augmenter la pression au niveau des voies respiratoires supérieures ou réduire la compliance thoracique et ainsi causer de l'apnée obstructive du sommeil (219). Finalement, plusieurs études ont montré un lien entre l'obésité et le risque de développer certains cancers incluant les cancers du côlon, du sein post-ménopause, de l'endomètre, du rein, de l'œsophage, du foie et du pancréas ainsi que des formes de lymphomes. Encore une fois, l'obésité viscérale semble être spécifiquement associée aux risques de cancers (220).

### **3 La stéatose hépatique non-alcoolique**

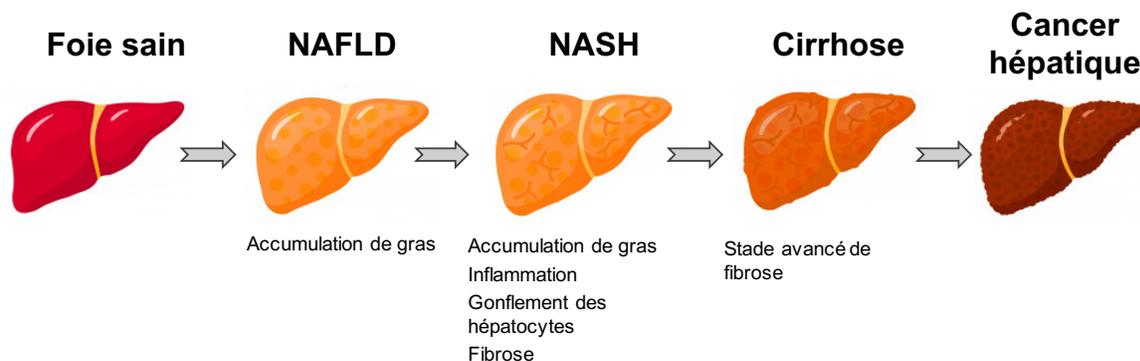
#### **3.1 Généralités sur la stéatose hépatique non-alcoolique**

La stéatose hépatique non-alcoolique (NAFLD ou *non-alcoholic fatty liver disease*) est définie par une accumulation excessive de gras dans le foie, en absence de consommation excessive d'alcool. En contexte d'obésité abdominale, le TA relâche en circulation des AG libres et des facteurs pro-inflammatoires qui sont transportés par la veine porte jusqu'au foie (20). Le foie capte les AG en excès et les accumule sous forme de TG. Les chylomicrons réménents et les particules LDL sont également des sources de TG pour le foie. La stéatose hépatique est considérée lorsque plus de 5% des hépatocytes possèdent des gouttelettes lipidiques (2,221). La prévalence de la NAFLD est de 25 à 30% chez les adultes dans les pays industrialisés. Dans 20% de ces cas, la NAFLD est classifiée comme stéatohépatite (NASH ou *non-alcoholic steatohepatitis*), une forme plus avancée avec la présence d'inflammation, d'hépatocytes dits « gonflés » et plus ou moins de fibrose (Figure 7) (222,223). Dans certains cas, la NASH peut évoluer vers des conditions plus sévères telles que la cirrhose, le cancer et la défaillance hépatique (222). La dérégulation du métabolisme hépatique est associée à l'inflammation, au stress du RE et à la fibrose. La NAFLD, autrefois considérée comme bénigne, est maintenant un fléau mondial puisqu'elle touche près de 20 à 40% de la population américaine, environ 50-60% des individus en surpoids, et plus de 90% des personnes atteintes d'obésité morbide (222,224). Ainsi, l'obésité représente un facteur de risque important pour le développement de la NAFLD. La NAFLD est une pathologie d'autant plus préoccupante puisqu'elle est associée à plusieurs désordres métaboliques tels que l'hypertriglycéridémie et des niveaux faible d'HDL, l'intolérance au glucose, la résistance à l'insuline, le diabète de type 2 et les maladies cardiovasculaires (223,225,226).

#### **3.2 Le développement de la NAFLD**

De façon générale la NAFLD et la NASH peuvent être définie par une incapacité du foie à prendre en charge les substrats énergétiques métaboliques primaires incluant les glucides et les AG, menant à l'accumulation d'espèces lipidiques toxiques. La présence de ces éléments dans la cellule induit du stress, des dommages aux hépatocytes et la mort de ces derniers pouvant conduire à la fibrogénèse et à l'instabilité génomique, des conditions de prédisposition à la cirrhose et au cancer du foie (227). La source et le devenir des AG

dans les hépatocytes semblent être clé dans l'apparition de la lipotoxicité, du stress du RE et des dommages cellulaires et ainsi dans le développement de la NASH (69).



**Figure 7: Développement et progression de la NAFLD.**

Les mécanismes impliqués dans le développement de la NAFLD reposent sur l'hypothèse d'un processus en multiples frappes. La première frappe est caractérisée par l'accumulation de TG et d'AG libres dans les hépatocytes, une conséquence de la résistance à l'insuline, d'un apport énergétique excédentaire et d'une lipogenèse hépatique plus active. Par la suite, un ensemble d'évènement peut apparaître incluant la peroxydation des lipides, des dysfonctions mitochondriales et de l'inflammation (223). Ces éléments induisent des dommages aux hépatocytes et le développement de la stéatose hépatique (Figure 7) (228). Il existe de nombreuses voies moléculaires pouvant intervenir dans le développement de la pathologie incluant les voies de l'inflammation (TLR-4, JNK, NF-kB), la voie de signalisation de l'insuline, et il est même incertain que le stade de NASH soit toujours précédé par la NAFLD. Il existe une importante hétérogénéité chez les patients atteints de NAFLD/NASH (229).

### 3.2.1 La source de lipides dans le foie et leur devenir

Le stockage des lipides sous forme de TG est considéré comme un mécanisme d'adaptation, de protection face à un excès d'AG et une incapacité à les métaboliser. Cependant, les TG en grande quantité peuvent également contribuer aux altérations métaboliques. Les TG qui ne sont pas exportés sous forme de VLDL du foie au sang forment des gouttelettes lipidiques dans les hépatocytes, la caractéristique principale de la NAFLD, et participent au pool d'AG dans les cellules. Bien que la nature exacte des lipides

lipotoxiques ne soit pas connue, les candidats potentiels inclus les DAG (230), les céramides (88,231), les résidus lysophosphatidylcholines (232,233), et le cholestérol (234,235). Des évidences suggèrent que l'apparition d'un stress lipotoxique peut être favorisé par le stress du RE, l'inflammation, une altération des cytokines et des adipokines, la déplétion d'ATP, une hypoxie intermittente observée dans les cas d'apnée du sommeil et des produits du microbiote intestinal. La contribution de chacun n'est pas connue et peut varier entre les individus (Figure 8) (227).

### 3.2.1.1 *L'assimilation des acides gras*

L'assimilation des AG libres par le foie dépend de la concentration des AG dans le plasma et de la capacité d'assimilation des AG par les hépatocytes. Cette dernière est dépendante du nombre et de l'activité des transporteurs d'AG et des protéines de transport (236) incluant FABP (*fatty acid binding protein*), CD36 (*fatty acid translocase*), FATP (*fatty acid transport protein*) (236–238). Les AG délivrés au foie par le sang proviennent majoritairement de la lipolyse des TG du TA et une minorité provient de la lipolyse des TG des lipoprotéines circulantes (239,240). Il a été montré que le taux de relargage des AG en circulation augmente avec l'expansion de la masse du TA chez l'humain (241). Cependant, la présence de la NAFLD/NASH est associée avec une augmentation du taux basal de lipolyse et une altération de la suppression de la lipolyse du TA médiée par l'insuline indépendamment du degré d'obésité (242–246). De plus, l'expression génique de certaines enzymes hépatiques lipolytiques incluant LIPC et LPL (*lipoprotein lipase*) est plus importante chez les patients obèses atteints de NAFLD que ceux n'ayant pas de NAFLD (247,248). Ces données suggèrent que la NAFLD est associée à un plus grand apport d'AG libres circulants au foie. La capacité du foie à assimiler les AG libres est également augmentée en présence de NAFLD comme suggérée par l'augmentation d'expression de plusieurs enzymes clés impliquées dans l'assimilation de lipides et du transport intracellulaire (248,249). Cependant, toutes les études ne montrent pas une augmentation de l'assimilation des AG hépatiques dans la NAFLD/NASH suggérant le rôle d'autres facteurs impliqués dans la stéatose hépatique (250).



### 3.2.1.2 *La lipogenèse de novo*

La lipogenèse *de novo* (LDN), la synthèse d'AG à partir de glucose ou de fructose, contribue très peu au pool d'AG hépatiques. Chez les individus sains, la LDN hépatique en état de jeûne ou postprandial est responsable de 5 à 10% des AG incorporés dans les TG intrahépatiques et les TG des VLDL, respectivement. Chez les patients souffrants de NAFLD, le taux de LDN hépatique en état de jeûne est faible et peut donc difficilement être le contributeur majoritaire de l'accumulation de lipides (251). Cependant, chez ces individus le taux de LDN en état postprandial, et plus précisément à la suite d'un repas riche en calorie, augmente et semble précéder une accumulation excessive de gras dans le foie (252). Des études suggèrent que la nature de la nourriture ingérée, et notamment les repas riches en glucides et en fructose, est impliquée dans l'élévation du taux de LDN et ainsi dans le développement de la NAFLD et la progression de la NASH (69). Dernièrement, la consommation excessive de boissons sucrées composées essentiellement de glucose ou d'un mélange de glucose et de fructose a été associée à l'accumulation de lipides dans le foie et au développement de la NASH et à l'apparition de nombreux cas de NASH chez des individus non obèses (69). Le foie est généralement considéré comme le site principal du métabolisme du fructose (253,254) supporté par des niveaux élevés d'expression des enzymes cataboliques du fructose et une sensibilité au fructose impliquée dans le développement de la stéatose hépatique (255–257). Des études ont mis en évidence un rôle du microbiote intestinal dans la conversion du fructose en acétate qui induit la LDN hépatique (258). Cependant, à des doses élevées, la capacité d'absorption et de clairance du fructose par l'intestin est dépassée. Dans ce cas, une partie du fructose n'est pas convertie par l'intestin et se retrouve dans le sang pour atteindre le foie où il induit la LDN (258). Ces données indiquent que les sodas et les jus, bien que considérés autrefois comme bénins parce qu'ils ne contiennent pas de matières grasses, sont en fait hépatotoxiques.

### 3.2.1.3 *L'oxydation des lipides*

Les AG sont métabolisés majoritairement par  $\beta$ -oxydation ou par estérification pour former des TG. Dans le foie, la  $\beta$ -oxydation se déroule principalement dans la mitochondrie et requiert le transport des AG du cytoplasme à la matrice mitochondriale (259). Pour ce faire, les AG sont activés par l'acyl-CoA synthétase (ACS) dans le cytoplasme pour devenir des acyl-CoA (260). Les membranes mitochondriales étant perméables aux acyl-CoA, ces derniers sont convertis en acyl-carnitine dans l'espace inter-membranaire mitochondriale par CPT1 (*carnitine O-palmitoyltransférase I*) (260). L'acyl-carnitine est éventuellement

transporté à travers la membrane interne mitochondriale par la translocase carnitine et de nouveau transformé en acyl-CoA par CPT2 (*carnitine O-palmitoyltransférase II*) (260). Une fois dans la matrice mitochondriale, les molécules d'acyl-CoA subissent la  $\beta$ -oxydation. Cette dernière consiste à l'hydrolyse successive de deux carbones pour former des molécules d'acétyl-CoA et également du NADH (*nicotinamide adenine dinucleotide*) et du FADH2 (*flavin adenine dinucleotide*) qui possèdent des électrons à haut potentiel utilisés dans la chaîne respiratoire (69,261).

Les résultats chez l'humain sont controversés et l'absence d'une méthode fiable pour mesurer directement l'oxydation des AG dans le foie *in vivo* rend leur interprétation difficile. Des données montrent que l'oxydation des AG hépatiques est soit normale soit augmentée chez les individus avec une NAFLD (249,262–265). Certains patients atteints de NASH présentent des dysfonctions mitochondriales et une altération de la  $\beta$ -oxydation dans le foie (263,266–269). Cependant, il n'est pas clair si la dysfonction mitochondriale prédispose à l'apparition de la NASH ou si l'altération de la fonction mitochondriale est une conséquence du stress cellulaire (227,266,270). La  $\beta$ -oxydation peroxisomale, principalement des AG à très longue chaîne, est également augmentée en contexte de NAFLD (271,272).

#### 3.2.1.4 La sécrétion des VLDL

Les TG hépatiques sont mobilisés et sécrétés sous forme de VLDL pour être délivrés aux tissus périphériques incluant le muscle squelettique, le cœur et le TA. Le taux de sécrétion des particules VLDL dépend de la disponibilité des TG mais aussi de la capacité d'assemblage des particules VLDL. La première étape de l'assemblage des particules VLDL est la lipidation de la molécule d'Apo B-100 pour former un précurseur VLDL, une molécule petite et dense. Lors de la seconde étape, ce précurseur se combine avec une large gouttelette de TG pour former une particule mature VLDL enrichie en TG qui est sécrétée dans le plasma (273). Chaque particule VLDL contient une molécule ApoB-100 requise pour l'export de VLDL à partir du foie. Les mécanismes impliqués dans l'altération de l'export des particules VLDL chez les individus atteints de NAFLD sont inconnus. Chez ces patients, le taux de sécrétion des VLDL est souvent très élevé alors que le nombre de particules en circulation est identique ou plus important (242,274). Ces données suggèrent que les particules VLDL sécrétées par les individus souffrants de NAFLD contiennent plus de TG et sont plus larges que les individus sains. Des études animales ont montré que les particules larges de VLDL excèdent le diamètre des pores endothéliaux sinusoidaux du foie empêchant leur sécrétion. Ainsi, ces particules restent piégées et s'accumulent dans le foie

participant au développement de la stéatose (275). Chez l'humain, la prise de poids augmente l'export des TG à partir du foie avec la sécrétion d'un plus grand nombre de particules VLDL-riche en TG. Cependant, cette augmentation n'est pas suffisante pour compenser l'augmentation de la production de TG intrahépatique (276,277).

#### 3.2.1.5 *Le rôle du cholestérol dans la NAFLD/NASH*

Le foie est un organe clé dans la régulation de l'homéostasie métabolique incluant le métabolisme du cholestérol (234,235). Des données récentes suggèrent que la détérioration de l'homéostasie du métabolisme du cholestérol ainsi que l'accumulation de cholestérol libre jouent un rôle dans le développement des pathologies NAFLD et NASH. L'accumulation de cholestérol libre dans le foie est la conséquence d'une dysfonction du transport du cholestérol intracellulaire et d'un déséquilibre de l'homéostasie cellulaire du cholestérol. Ce dernier est caractérisé par l'activation des voies de biosynthèse du cholestérol, une désestérification accrue du cholestérol, et une atténuation des voies d'exportation du cholestérol et de synthèse des acides biliaires (278). Dans ce contexte, le stress du RE active la libération de facteurs de transcription qui jouent un rôle dans la synthèse des AG et du cholestérol incluant SREBP-1c (*sterol regulatory element binding protein-1c*) et SREBP-2 (*sterol regulatory element binding protein-2*), respectivement (275,279,280).

L'accumulation de cholestérol libre active des voies de signalisation cellulaire dans les cellules de Kupffer, les cellules stellaires hépatiques (CSH) et les hépatocytes. L'activation des cellules de Kupffer et des CSH induit l'inflammation et la fibrogenèse (281). D'autre part, l'accumulation de cholestérol libre dans les mitochondries des hépatocytes induit des dysfonctions mitochondriales. En effet, le cholestérol libre qui s'accumule est responsable de changements dans la fluidité et la dynamique de la membrane mitochondriale et altère le transport mitochondrial de glutathion (234). Ces événements augmentent la production des espèces réactives à l'oxygène et déclenchent la réponse UPR dans le RE, et donc le stress du RE et l'apoptose (282). Tous ces phénomènes créent un cercle vicieux qui contribue à la maintenance de la stéatose et promeut la mort des hépatocytes et des dommages hépatiques, qui peuvent mener à la progression de la pathologie (283).

### 3.2.1.6 Les acides biliaires

La production d'acides biliaires résulte de l'oxydation du cholestérol dans le foie. Les acides biliaires jouent un rôle dans l'absorption des lipides au niveau de l'intestin et dans le métabolisme du cholestérol. De plus, les acides biliaires sont impliqués dans des voies de signalisation et activent les récepteurs nucléaires FXR (*farnesoid X receptor*), PXR (*pregnane X receptor*), VDR (*vitamin D receptor*) et la protéine G couplée au récepteur TGR5 (*G protein-coupled bile acid receptor 1* ou GPBAR1) (284). Les acides biliaires réduisent la gluconéogenèse hépatique, améliorent l'homéostasie du glucose via l'activation de FXR (285,286) et PXR (287). Ils augmentent la dépense énergétique dans le TAB et améliore le métabolisme du glucose et la sensibilité à l'insuline via TGR5. Les acides biliaires agissent par des mécanismes indirects puisque l'expression de ces récepteurs est très faible dans le reste des tissus. En contexte de NAFLD, les niveaux d'acides biliaires hépatiques et en circulation sont augmentés (288–290). Les acides biliaires semblent être impliqués dans les altérations métaboliques associées à la NAFLD/NASH et plus particulièrement à la résistance à l'insuline. Des études supplémentaires sont requises pour identifier les mécanismes par lesquels les acides biliaires influencent le métabolisme en contexte de NAFLD/NASH (277,291).

### 3.2.1.7 Les autres sources de lipides lipotoxiques

L'accumulation excessive de lipides dans le foie, comme observée dans la NAFLD, mène à l'accumulation d'espèces lipidiques lipotoxiques dont les DAG et les céramides, associés à la résistance à l'insuline. L'accumulation de DAG dans le foie est associée à l'activation de la voie de signalisation PKC- $\epsilon$  qui altère la signalisation de l'insuline par l'inhibition de l'activation des protéines IRS (66,84,292). Des études ont montré que la distribution des DAG dans la cellule affecte les propriétés lipotoxiques de ces dernières. Par exemple, une étude chez le rat utilisant une diète riche en gras qui promeut la résistance à l'insuline montrent l'augmentation de la quantité de DAG localisés dans le cytosol et la membrane de la cellule. Il y a également une plus forte activation de PKC- $\epsilon$  traduite par la translocation de PKC- $\epsilon$  du cytosol à la membrane où il inhibe la signalisation de l'insuline (65,66). Chez l'humain, l'accumulation de DAG dans le foie et l'activation de PKC- $\epsilon$  sont des prédictors de la sensibilité à l'insuline (87).

Les céramides appartiennent à la famille de lipides des sphingolipides et sont des constituants de la structure de la double couche lipidique de la membrane cellulaire (293).

Les céramides possèdent également des propriétés de signalisation cellulaire. Des études suggèrent que l'accumulation de céramides dans le foie et plus particulièrement dans un contexte d'apport excessif d'AG libres au foie, participe à la résistance à l'insuline (294). En effet, les céramides sont d'importants messagers qui interagissent dans plusieurs voies de signalisation qui affectent la signalisation de l'insuline, la fonction mitochondriale, l'oxydation des lipides et ainsi promeut l'inflammation, le stress oxydatif et la mort cellulaire des éléments associés à la NAFLD (295). La production de céramides dans les hépatocytes a été associée à plusieurs facteurs de risques de la NAFLD incluant la diminution d'adiponectine, l'augmentation de cytokines inflammatoires (TNF- $\alpha$  et IL-6) et le stress oxydatif (296). Les deux derniers pourraient favoriser la génération de céramides et ainsi maintenir les dommages cellulaires induits par l'inflammation, induisant la dysfonction mitochondriale et facilitant ainsi le développement de la NAFLD (277,297).

### 3.2.2 Le stress du réticulum endoplasmique

Le RE joue un rôle important dans le métabolisme de synthèse des AG et du cholestérol (117). Plusieurs études permettent d'établir une relation bidirectionnelle entre le stress du RE et la NAFLD/NASH. Autrement dit, la stéatose induit le stress du RE et inversement, la réponse au stress du RE mène à la stéatose. Le stress du RE est présent dans des conditions physiologiques (125). Cependant, dans les cas de NAFLD, le stress du RE devient chronique. D'autre part, le stress du RE favorise l'accumulation de gras dans les hépatocytes par l'induction de la LDN et la perturbation de l'activité mitochondriale. Tel que mentionné plus haut, le stress du RE active SREBP qui active la synthèse de lipides (275,279,280). D'autres mécanismes indirects qui affectent la sécrétion des VLDL, la formation d'autophagosome, la stabilité de protéines hépatiques clés sont impliqués. Ces mécanismes favorisent l'inflammation, le stress oxydatif et la mort cellulaire, et ainsi l'apparition de formes plus sévères de la NAFLD dont la NASH et la fibrose (117,125).

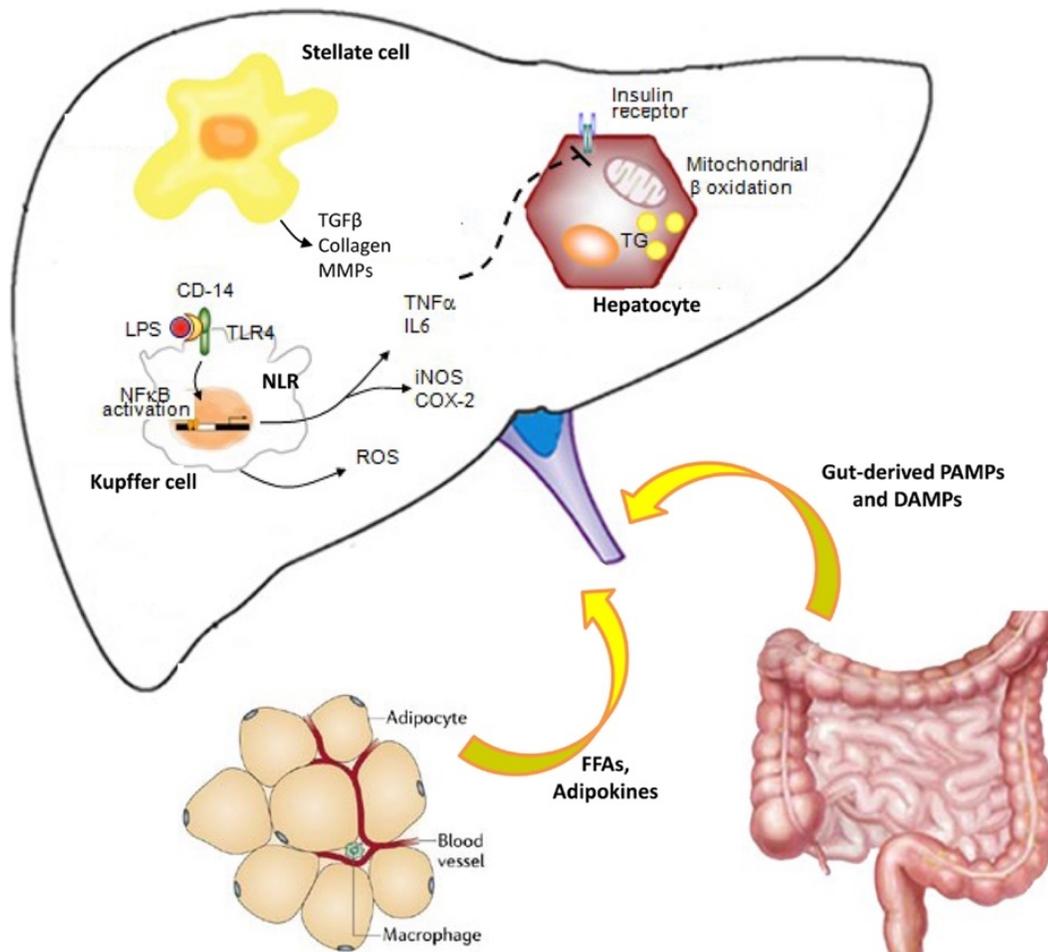
### 3.2.3 L'inflammation

La progression de la NAFLD en NASH est marquée par l'apparition d'inflammation dans le foie causée par différents mécanismes principalement associés à l'accumulation excessive de lipides. La réponse immunitaire est initiée dans le but de restaurer la fonction du tissu mais lorsqu'elle est exagérée ou qu'elle perdure, l'inflammation peut avoir des effets délétères et mener à la dysfonction du foie notamment avec la formation de tissu cicatriciel et une déformation de l'architecture vasculaire. La peroxydation des lipides dans les

hépatocytes favorise la prolifération des CSH, l'augmentation de la production de matrice extracellulaire (MEC) et la formation de fibrose. Les espèces réactives à l'oxygène induisent la libération de cytokines par les hépatocytes qui activent divers mécanismes immunitaires responsable d'augmenter les dommages induit au foie (64,298,299).

La réponse inflammatoire peut également être initiée et maintenue par des molécules libérées par les cellules endommagées ou en train de mourir dans le but de rétablir l'homéostasie et réparer les tissus endommagés (Figure 9). Ces molécules, nommées DAMPs (*Damage Associated Molecular Patterns*), vont activer l'inflammasome, un complexe multiprotéique cytoplasmique (300). Son activation est impliquée dans l'initiation du stress métabolique, la mort cellulaire et l'apparition de la fibrogenèse dans la NASH. Dans ce contexte, les DAMPs incluent les AG saturés produits de la LDN, certains composants de la mitochondrie et les PAMPs (*Pathogen Associated Molecular Patterns*). Plusieurs éléments dérivés de la mitochondrie, les mito-DAMPs, partagent des similarités avec les bactéries et sont considérés comme hautement immunogène. Les mito-DAMPs sont libérés par les hépatocytes endommagés ou mourants et sont impliqués dans le développement de la fibrose hépatique (301). Les PAMPs sont des molécules d'origine bactérienne libérées lors de l'altération de la muqueuse intestinale associée aux dommages hépatiques induit par la NAFLD/NASH. Les PAMPs circulent jusqu'au foie et activent les cellules immunitaires (302). De plus, l'activation de l'inflammasome est aussi impliquée dans la promotion de l'apoptose via l'activation de caspase-1 (303).

L'inflammation peut également être modulée par les facteurs inflammatoires libérés par le TA qui sont capables d'activer les cellules immunitaires résidentes du foie (64). Finalement, des études ont associé la réponse UPR à l'inflammation et notamment les branches PERK et IRE $\alpha$  qui sont impliquées dans l'activation des voies NF- $\kappa$ B et JNK (304–306). L'activation de NF- $\kappa$ B est reportée dans les cas de NASH et induit l'augmentation de la transcription de gènes pro-inflammatoires (299). JNK quant à lui, comme mentionné auparavant, induit la résistance à l'insuline par la phosphorylation et dégradation de IRS1 avec pour conséquence une diminution de la signalétique en aval du récepteur à l'insuline (64).



**Figure 9: Communication entre les cellules immunitaires en présence d'inflammation dans le foie. Adapté de (307).**

Les modèles moléculaires associés aux agents pathogènes (PAMP) et les modèles moléculaires associés aux dommages (DAMP) se lient aux récepteurs de reconnaissance de modèle (PRR), y compris les récepteurs TLR et les récepteurs NLR. Par conséquent, les cellules immunitaires innées du foie initient et maintiennent le processus d'inflammation hépatique par la production de cytokines inflammatoires. Les cellules de Kupffer sont frappées par des bactéries ou des insultes et contribuent à la production de cytokines et à l'activation des cellules stellaires hépatiques pour maintenir l'équilibre entre la signalisation inflammatoire et la fibrogenèse. Les adipokines sécrétées par le tissu adipeux et les cytokines inflammatoires altèrent la signalisation hépatique de l'insuline, entraînant une résistance à l'insuline. Tous ces événements conduisent à un cercle vicieux qui provoque une aggravation des lésions hépatiques, une nouvelle inflammation et une progression de la maladie.

### 3.2.3.1 La réponse immunitaire innée en réponse au stress hépatique

La première réponse inflammatoire mise en place en réponse aux DAMPs et PAMPs est une réponse immunitaire innée (308). La grande majorité des cellules hépatiques possèdent des récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires nommés PRR (*pattern recognition receptors*). Les PRR peuvent être divisés en 4 classes : TLR, NLR (*Nucleotide*

*oligomerisation receptors*), les récepteurs de lectine de type C et les récepteurs de type RIG-1. Les PRR reconnaissent les PAMPs, des molécules spécifiques aux pathogènes (104). Les TLR sont les récepteurs essentiels dans la réponse immunitaire innée et activent 3 voies de signalisation : MAPK (*Mitogen activated protein kinase*), NF- $\kappa$ B et INF- $\gamma$  (*Interferon regulatory transcription factor*). L'activation de ces voies peut résulter en la production de cytokines pro- et anti-inflammatoires (103,303).

Plusieurs cellules immunitaires interviennent dans l'immunité innée incluant entre autres les neutrophiles, les monocytes, les cellules de Kupffer et les plaquettes (Figure 9). Les DAMPs sont à l'origine du recrutement des neutrophiles au site des dommages hépatiques (309). Les neutrophiles ont une grande capacité de phagocytose et possèdent de nombreuses molécules antimicrobiennes. Cependant, les neutrophiles pourraient également augmenter la cytotoxicité des macrophages et promouvoir un état d'inflammation chronique (310). De plus, les DAMPs sont reconnus pour activer la voie des TLRs et régulent la libération de cytokines et chimiokines telles que TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  et IL-6 (311). Les monocytes possèdent des fonctions de production d'intermédiaires inflammatoires, la clairance des neutrophiles, la production de MEC et l'angiogenèse (312). Les monocytes peuvent être pro-inflammatoires avec la production de cytokines et chimiokines inflammatoires, la production de protéases et faciliter la clairance. Les monocytes considérés anti-inflammatoires produisent des cytokines anti-inflammatoires dont IL-10 (*interleukin-10*), TGF- $\beta$  (*transforming growth factor-1 $\beta$* ) et VEGF (*vascular endothelial growth factor*) (313). Les cellules de Kupffer, les macrophages résidents du foie, recrutent les cellules immunitaires, favorisent la réparation et le remodelage tissulaire. De plus, d'autres macrophages peuvent être recrutés au site de dommages incluant des macrophages pro-inflammatoires (type M1) ou anti-inflammatoires (type M2) qui contribuent aux dommages ou aux réparations, respectivement (314). Les plaquettes peuvent produire des cytokines et chimiokines inflammatoires et ainsi attirer les neutrophiles aux sites d'inflammation (315). Les cellules NK (*natural killer*) tuent les cellules cibles dont les CSH impliquant une apoptose induite par la voie TNF (316).

### 3.2.3.2 *La réponse immunitaire chronique*

La persistance de ces signaux induit une réponse inflammatoire chronique responsable d'une réparation anormale du tissu et l'apparition de fibrose (300,311). La réponse immunitaire acquise est médiée par les lymphocytes T (thymus), impliqués dans l'immunité à médiation cellulaire, ou B (*bone marrow derived*), impliqués dans l'immunité

humorale. Les lymphocytes T et B reconnaissent les antigènes du non soi et induisent des réponses pour éliminer les agents pathogènes spécifiques ou pour inhiber l'expression des cellules exprimant des antigènes du non soi (317). Les lymphocytes T auxiliaires (ou *helper*) ont la capacité d'activer d'autres cellules immunitaires et d'augmenter la phagocytose des macrophages. En réponse aux cytokines, les lymphocytes T auxiliaires peuvent développer un profil pro-inflammatoire (Th1) ou anti-inflammatoire (Th2). Les cellules Th1 sécrètent les cytokines TGF- $\beta$  et IFN- $\gamma$  qui induit les macrophages pro-inflammatoires M1. Les cellules Th2 sécrètent quant à elles IL-4, IL-5 et IL-10 (317). De plus, les lymphocytes T auxiliaires producteurs d'IL-17 sécrètent IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22 et TNF- $\alpha$  qui sont hautement impliqués dans l'inflammation et le développement de la fibrose hépatique (318,319). La libération de cytokines par les cellules immunes activées augmente le stade inflammatoire du foie et favorise l'apparition de la fibrose (299,303).

### 3.2.3.3 *La mort cellulaire en réponse au stress hépatique*

La mort cellulaire peut être classifiée selon une mort non-inflammatoire, l'apoptose, ou une mort inflammatoire, la nécrose, la pyroptose, la nécroptose. La réponse immunitaire induite par les signaux libérés dépend de la nature de la mort cellulaire. L'apoptose maintient l'intégrité de la membrane et de ce fait n'induit pas de réponse immunitaire. Les cellules apoptotiques relâchent des molécules inhibitrices du recrutement et de l'activation des neutrophiles. En revanche, pendant la nécrose, des DAMPs sont relâchées activant l'inflammasome (309). La nécrose produit également des signaux inflammatoires en modifiant les composants de la MEC. De plus, la nécrose peut résulter d'une mort cellulaire programmée incluant la pyroptose et la nécroptose. La pyroptose est initiée par l'activation de la caspase-1 médiée par l'inflammasome qui résulte en la mort des cellules lytiques et la production d'interleukine incluant l'IL-1 et l'IL-18 (320). La nécroptose est activée par des signaux de mort cellulaire extérieurs tels que TNF, le récepteur de l'interféron et certaines voies des TLRs (321). L'activation de la nécroptose par ces signaux induit l'inhibition de la caspase-8 qui promeut l'apoptose (303).

### 3.2.4 La fibrose hépatique

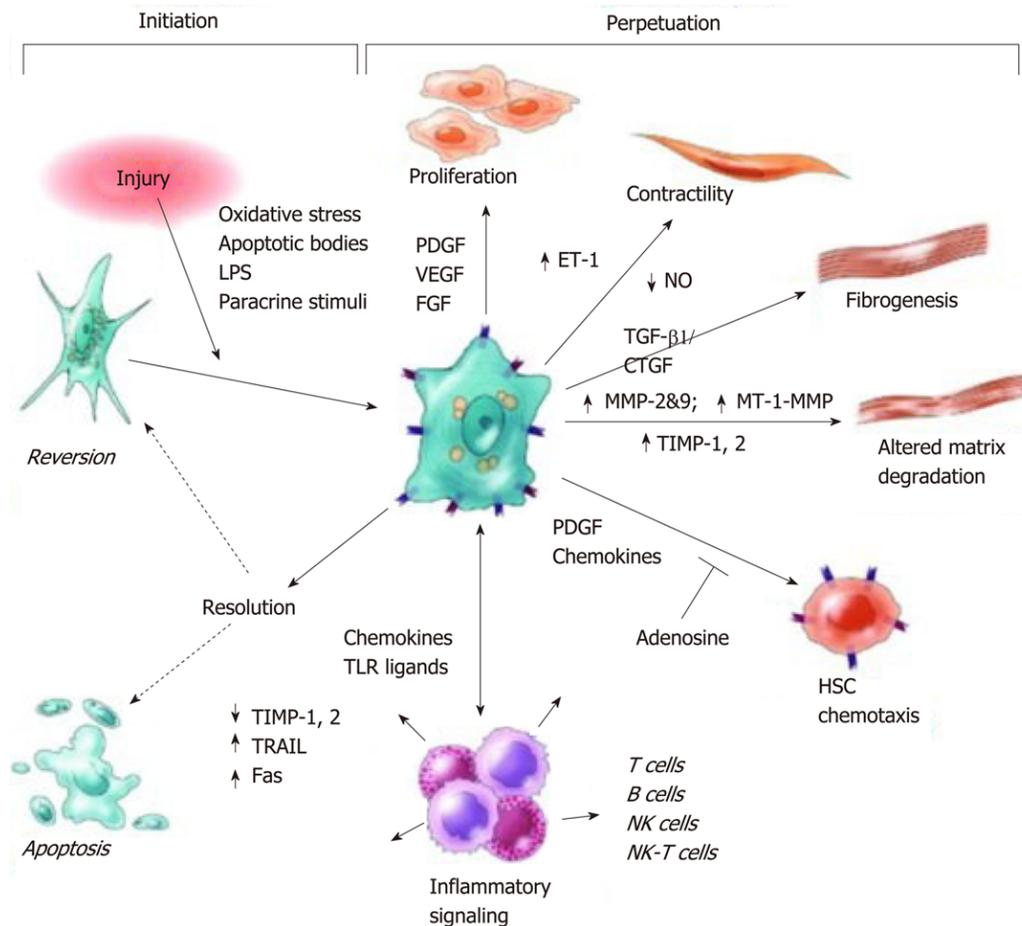
La fibrose est souvent considérée comme un mécanisme néfaste aggravant la pathologie. Cependant, la fibrose est une étape normale du processus de guérison. La fibrose est caractérisée par une accumulation de protéines de la MEC le plus souvent induite par l'inflammation. Les caractéristiques de la fibrose sont spécifiques à chaque pathologie.

Ainsi, la fibrose associée à la NASH se localise au niveau péri-cellulaire et péricellulaire dans les zones centrilobulaires, alors que la fibrose des pathologies virales et autoimmunes se localise plutôt au niveau periportal (303).

Il existe un équilibre entre la quantité de MEC formée et la quantité dégradée. En condition physiologique, ce processus dynamique permet ainsi de garder une même quantité de MEC. Au niveau cellulaire, les cellules les plus impliquées dans le développement de la fibrose hépatique sont les CSH, constituants majeurs de la MEC dans un foie sain ou malade. Les CSH, des cellules non-parenchymales résidentes, se localisent dans l'espace de Disse, un lieu propice à la communication intercellulaire et notamment avec les hépatocytes, les cellules endothéliales et les cellules de Kupffer. Lorsque les CSH sont dans un état de quiescence, elles stockent des lipides et notamment une grande quantité de vitamine A sous forme de rétinol. L'activation des CSH induit leur transformation en myofibroblastes profibrogéniques. Ces derniers jouent un rôle dans la régulation de la formation et la dégradation de la MEC et ont également des propriétés contractiles. Les myofibroblastes impliqués dans ce processus peuvent aussi être dérivés de fibroblastes portaux, de cellules recrutées de la moelle osseuse et de cellules épithéliales qui transitent en cellules mésenchymales incluant les hépatocytes et les cholangiocytes (299,303).

L'activation des CSH comprend une étape d'initiation suivie d'une étape de perpétuation (Figure 10). En contexte de dommages hépatiques, les hépatocytes stressés et endommagés ainsi que les macrophages activés, les cellules de Kupffer et les plaquettes libèrent des signaux responsables de l'activation des CSH. Ces signaux peuvent être des cytokines fibrogéniques, la fibronectine, PDGF (*platelet-derived growth factor*), les espèces réactives à l'oxygène et les corps apoptotiques (227). L'état de perpétuation suit l'activation et se caractérise par une accumulation de MEC et la formation de tissu cicatriciel. La phase de perpétuation est accompagnée de réponses fonctionnelles incluant la prolifération, la fibrogénèse, la chimiotaxie, la contractilité, la dégradation de la matrice, la perte de rétinol et l'expression de cytokines. Dans cette phase, les CSH prolifèrent rapidement en réponse à des médiateurs incluant PDGF,  $TNF\alpha$ , VEGF, la thrombine et EGF (*epidermal growth factor*) (227,322,323). La fibrogénèse est caractérisée par une accumulation de MEC supérieure à la dégradation. La production de MEC est induite par des cytokines profibrogéniques incluant  $TGF\beta 1$  et CTGF (*connective tissue growth factor*). La chimiotaxie est un mécanisme permettant au CSH de migrer vers les chimiokines au site de dommage (324). L'activation des CSH induit le remodelage tissulaire avec l'augmentation du nombre

de CSH contractiles avec pour conséquence une potentielle résistance sinusoidale observée dans les cas de NASH (325). Les CSH activées expriment des TIMPs (*tissue inhibitors of metalloproteinases*) qui régulent les MMPs (*matrix metalloproteinases*), les enzymes majoritaires impliquées dans la dégradation de la MEC (326,327). Les CSH ont un rôle important dans l'infiltration de cellules immunitaires et expriment des chimiokines qui recrutent les neutrophiles, les macrophages, les cellules T NK, les cellules dendritiques et les cellules T (303).



**Figure 10: Voies d'activation des cellules hépatiques stellaires. Adapté de (303).**

L'initiation est provoquée par des stimuli solubles qui incluent des signaux de stress oxydant, des corps apoptotiques, des lipopolysaccharides et des stimuli de cytokines provenant de cellules voisines. La perpétuation est caractérisée par des changements phénotypiques spécifiques, notamment la prolifération, la contractilité, la fibrogénèse, la dégradation de la matrice modifiée, la chimiotaxie et la signalisation des cytokines. CTGF: facteur de croissance du tissu conjonctif; ET: endothéline; FGF: facteur de croissance des fibroblastes; LPS: lipopolysaccharide; MMP: métalloprotéinase matricielle; MT-1: membrane de type 1, NK: tueur naturel, NO: oxyde nitreux; PDGF: facteur de croissance dérivé des plaquettes; TIMP: inhibiteur tissulaire des métalloprotéases; TGF: facteur de croissance transformant; TLR: récepteur de type Toll; TRAIL: ligand induisant l'apoptose lié au facteur de nécrose tumorale; VEGF: facteur de croissance endothélial vasculaire.

### **3.3 Le diagnostic et le traitement de la NAFLD**

La NAFLD est le plus souvent suspectée lorsque les patients présentent plusieurs comorbidités. La NASH quant à elle est diagnostiquée lorsque les aminotransférases sanguines, alanine aminotransférase (ALT) et aspartate aminotransférase (AST), sont élevées ou qu'une imagerie accidentelle la détecte. Le diagnostic de la NAFLD et des différents stades repose principalement sur des analyses d'imageries ou histologiques (328–330). Les méthodes d'imagerie comprennent les ultrasons, la tomodensitométrie, ou l'imagerie à résonance magnétique (IRM). Ce sont des méthodes non-invasives et relativement fiables. Les ultrasons et la tomodensitométrie ont une sensibilité et une fiabilité comparable qui détecte la stéatose lorsqu'elle est répartie sur 20% ou plus de la masse du foie (331). En revanche, l'IRM permet de détecter une stéatose qui touche seulement 5% du foie mais est cependant une méthode beaucoup plus coûteuse (332,333). Le diagnostic de la NAFLD repose uniquement sur la détection d'une accumulation anormale de lipides dans le foie. Le diagnostic précis de la NASH et de son stade, caractérisée par la stéatose, les hépatocytes endommagés, une inflammation, et avec différents degrés de fibrose, demande quant à lui une biopsie hépatique et des analyses histologiques (222,334).

Il n'existe actuellement aucuns marqueurs exclusifs à la NAFLD/NASH ce qui rend son diagnostic difficile. Le marqueur le plus utilisé pour identifier les patients atteints de NASH est l'ALT mais il possède une faible sensibilité, inférieure à 50% (335). De nombreuses études sont en cours de réalisation pour étudier le potentiel de nouveaux biomarqueurs et méthodes d'imagerie pour être utilisés dans le diagnostic de la NASH sans avoir à réaliser de biopsie (336). Les techniques cliniques utilisées incluant le score fibrotique et les techniques d'élastographie sont performantes pour identifier les fibroses avancées. Cependant, la majorité des patients atteints de NAFLD incluant les patients possédant des cirrhoses précoces sont souvent asymptomatiques et ont des analyses sanguines normales. Ainsi, ces patients peuvent progresser vers une cirrhose sans être diagnostiqués (328,337). Il existe donc un réel besoin pour le diagnostic et le traitement de la NAFLD/NASH (222,229).

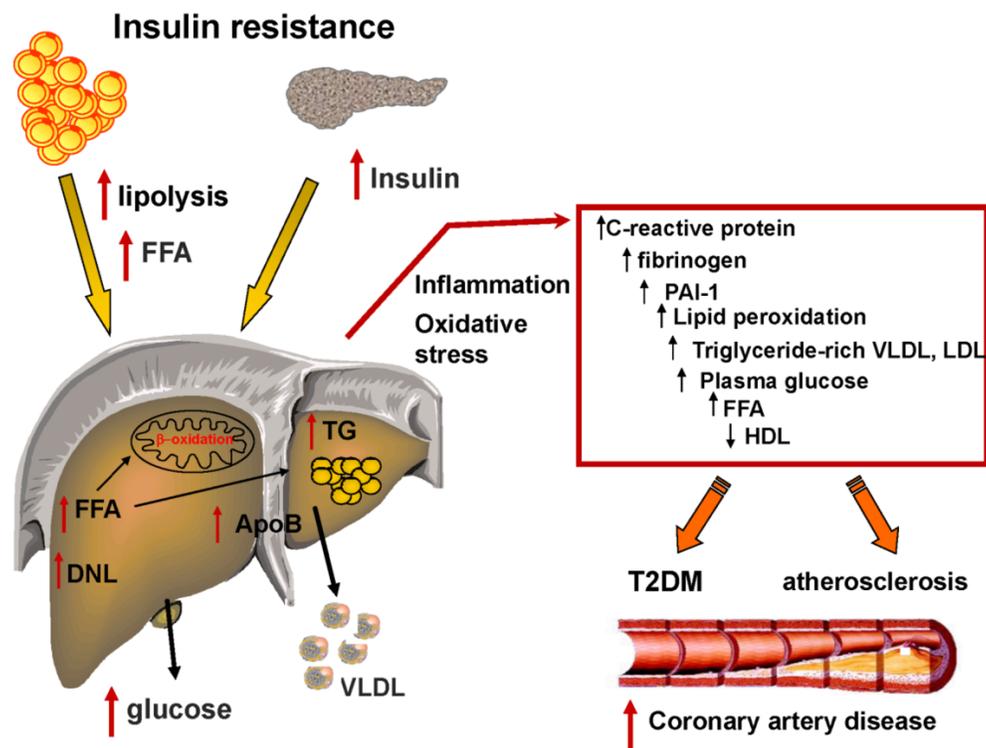
### 3.4 La relation entre la NAFLD et l'athérosclérose

Les MCV sont les premières causes de décès chez les patients atteints de NAFLD/NASH (338–340). Des études ont montré que les patients souffrants d'une NASH avec un stade de fibrose avancée sont à plus grand risque de développer de l'athérosclérose que les patients atteints d'une stéatose simple (341,342). La NAFLD/NASH possède une forte corrélation avec l'athérosclérose et l'hypertension (343,344). La NAFLD est notamment associée à l'épaisseur de l'intima-media carotidienne, un indice utilisé en clinique pour évaluer l'athérosclérose et sa progression, et de la plaque carotidienne (345–347).

La NAFLD et l'athérosclérose sont toutes deux des pathologies multifactorielles qui coïncident souvent ensemble et avec des caractéristiques du syndrome métabolique incluant la résistance à l'insuline, la dyslipidémie et l'hypertension (Figure 11) (348). Ainsi, il est difficile d'évaluer la contribution de la NAFLD dans l'athérosclérose. Les mécanismes impliqués dans cette relation ne sont pas totalement connus. Cependant, plusieurs facteurs de la NAFLD sont suggérés contribuer dans l'athérosclérose. Parmi ceux-ci, il y a l'augmentation de la lipolyse et de la sécrétion de VLDL (242,349), le profil des lipoprotéines athérogènes, c'est-à-dire l'augmentation des petites fractions LDL denses et la réduction des fractions HDL (345,350), l'hyperglycémie due à la surproduction hépatique de glucose, et la libération accrue de facteurs inflammatoires tels que le fibrinogène et la protéine C réactive (CRP) (349,350).

La dyslipidémie associée à la NAFLD est pro-athérogène et se caractérise par une augmentation plasmatique des VLDL et des TG et une diminution du cholestérol HDL. Les lipoprotéines jouent un rôle important dans les mécanismes impliqués dans la dyslipidémie associée à la NAFLD. Une étude a montré que l'ApoB joue également un rôle dans l'association entre la NAFLD et l'athérosclérose (351). Les niveaux élevés de LDL, des lipoprotéines contenant de l'ApoB, sont fortement associés aux MCV et à l'athérosclérose. De plus, les particules LDL en excès sont oxydées dans les parois des vaisseaux sanguins et attirent les macrophages qui par la suite se transforment en cellules spumeuses, donnant ainsi naissance aux plaques d'athéromes (352,353). En réponse au stress en contexte de NAFLD, le foie sécrète des molécules pro-inflammatoires et des facteurs pro-coagulants incluant IL-6,  $TNF\alpha$ ,  $NF-\kappa B$ , MCP-1, fibrinogène, et PAI-1 (*plasminogen activator inhibitor-1*) qui peuvent avoir un impact sur les risques cardiovasculaires (354). En effet, l'augmentation de CRP promeut l'inflammation et l'expression de PAI-1 et des molécules

d'adhésion des cellules endothéliales résultant en l'accélération de l'athérosclérose par l'inhibition de la formation d'oxyde nitrique et l'augmentation de l'assimilation de LDL dans les macrophages (355). Des études humaines ont montré que les facteurs pro-coagulants sont plus élevés chez les individus avec une NASH qu'avec une stéatose simple. Cette relation semble être indépendante de l'obésité et d'autres anomalies métaboliques (354). Finalement, la résistance à l'insuline est associée à la NAFLD mais aussi à l'athérosclérose. L'hypertriglycéridémie réduit la libération d'oxyde nitrique, augmente l'expression de molécules d'adhésion des cellules vasculaires et stimule l'absorption de particules LDL oxydées par les macrophages (356). Des études sont encore nécessaires pour éclaircir les mécanismes liant la NAFLD à l'athérosclérose.



**Figure 11: Lien entre la résistance à l'insuline, la dyslipidémie métabolique et l'athérosclérose. Adapté de (357).**

La résistance à l'insuline est associée à une augmentation du flux d'acides gras libres (AGL) qui contribue à l'augmentation de la production de triglycérides (TG) qui, à son tour, stimule l'assemblage et la sécrétion de VLDL dans les hépatocytes. L'accumulation de graisse dans le foie est associée au stress oxydatif et à la peroxydation lipidique. De plus, les sujets atteints de NAFLD ont une sécrétion accrue de marqueurs inflammatoires, de glucose plasmatique et une diminution de la concentration de HDL. La conséquence de ce dysfonctionnement physiologique est un risque accru de développer un diabète et une athérosclérose et un risque accru de maladie coronarienne.

## **4 Les hépatokines**

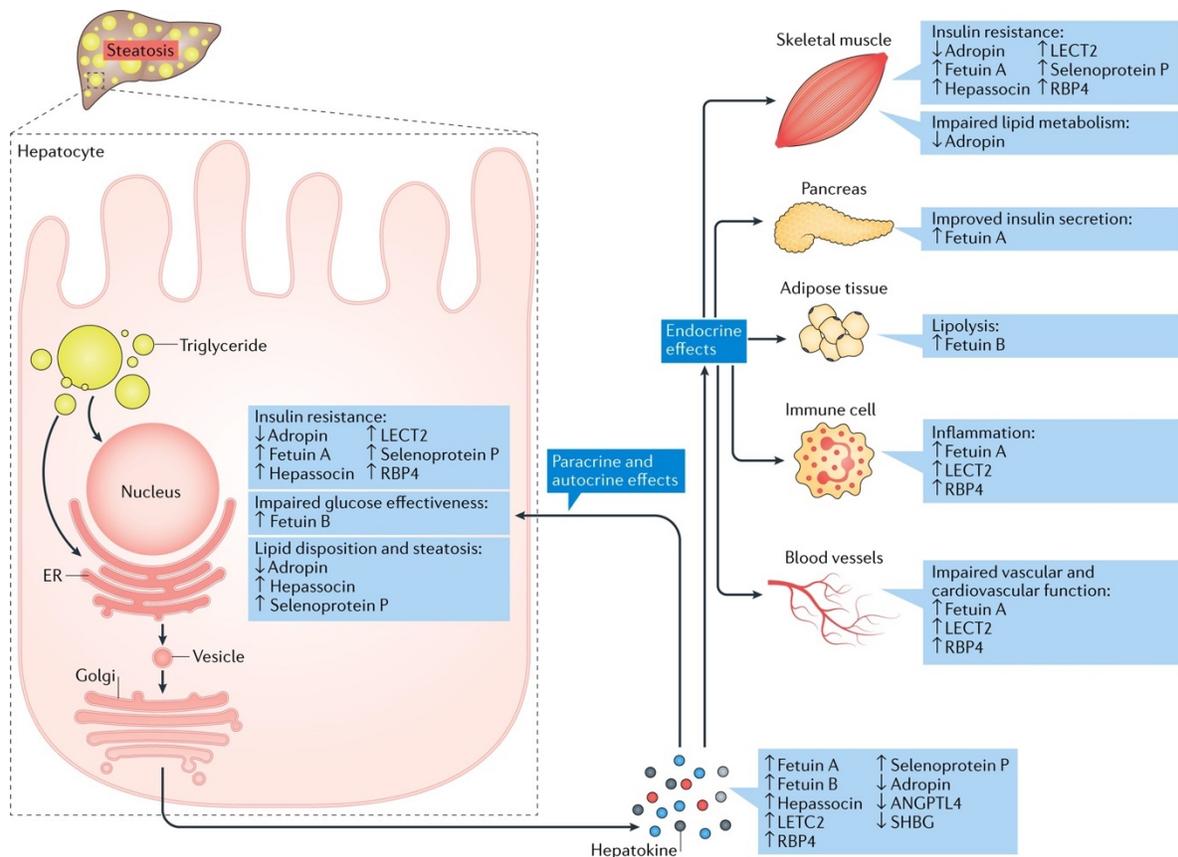
### **4.1 Qu'est-ce qu'une hépatokine?**

Le foie est un organe sécrétoire qui participe à la communication inter-tissus. En effet, il a été montré que les tissus communiquent entre eux par l'intermédiaire de facteurs, nommés organokines (358), qu'ils sécrètent avec des actions autocrine, paracrine et/ou endocrine. Le foie est un organe volumineux, très vascularisé permettant la distribution des facteurs sécrétés aux tissus périphériques. Les hépatocytes et les cellules non-parenchymales sécrètent les facteurs dans les sinusoides du foie qui vont circuler de la veine centrale à la veine cave inférieure et éventuellement jusqu'au cœur pour être redistribués aux tissus périphériques (277).

La sécrétion des protéines peut se diviser en deux groupes : la voie classique et la voie non classique. La voie classique implique le transport des protéines nouvellement synthétisées via des organelles de la machinerie sécrétoire tels que le RE, l'appareil de Golgi, jusqu'à la membrane plasmique grâce à des vésicules ou granules. Les protéines transmembranaires sont acheminées jusqu'à la membrane et les protéines solubles jusque dans l'espace extracellulaire. Les protéines sécrétées par cette voie possèdent un peptide signal à leur extrémité N-terminale et des modifications post-traductionnelles qui sont achevées dans le RE et le golgi (359). La voie de sécrétion non classique concerne les protéines qui ne possèdent pas de peptide signal en N-terminale. Ces protéines sont alors transportées par l'intermédiaire de vésicules extracellulaires (360,361). Les hépatokines peuvent avoir un impact sur le foie lui-même, une action autocrine, ou sur les tissus périphériques plus ou moins éloignés, une action endocrine/paracrine.

### **4.2 Les hépatokines, la NAFLD et l'obésité**

Des études ont montré que la NAFLD altère la sécrétion des hépatokines et ainsi la communication entre les tissus impactant le métabolisme, induisant de l'inflammation et de la résistance à l'insuline. En effet, plusieurs hépatokines identifiées ont été associées au métabolisme du glucose, à la résistance à l'insuline, au diabète de type 2 et à l'inflammation (221,277,358). Ces hépatokines seront décrites dans la section suivante (Figure 12, Tableau 1).



Nature Reviews | Endocrinology

**Figure 12: Stéatose hépatique, sécrétion d'hépatokines et dérégulation métabolique. Adapté de (221).**

Le sécrétome des hépatocytes subit des changements marqués en réponse à la stéatose hépatique. L'augmentation des niveaux intrahépatiques de triglycérides induit des changements dans la transcription des hépatokines et leur repliement dans le réticulum endoplasmique (ER), entraînant une augmentation de la sécrétion de certaines hépatokines pendant la stéatose (↑) et une diminution de la sécrétion d'autres hépatokines (↓). Les hépatokines sont sécrétées et agissent de manière autocrine et paracrine pour signaler aux hépatocytes, et de manière systémique par leur transport vers des tissus cibles éloignés, y compris le muscle squelettique, le tissu adipeux, les vaisseaux sanguins et le pancréas. Les effets métaboliques d'une augmentation et d'une diminution des concentrations d'hépatokines spécifiques conduisent au développement d'une résistance à l'insuline, d'une intolérance au glucose, d'une accumulation de lipides ectopiques, d'une inflammation et d'une altération de la sécrétion d'insuline.

Activin E est un membre de la famille du TGFβ et est encodé par le gène *inhibin βE* (362). Activin E est augmentée dans le foie et dans le sérum en contexte d'obésité (363) et de NAFLD (364) chez l'humain. La surexpression d'Activin E chez des souris nourries avec une diète riche en gras réduit l'accumulation de gras et améliore la tolérance au glucose en comparaison à des souris sauvages. De plus, la surexpression d'Activin E augmente l'expression de protéines thermogéniques dans le TA et la température corporelle est plus

élevée suggérant une augmentation de la respiration découplée. D'autre part, les souris déficientes pour *Activin E* ne maintiennent pas leur température corporelle lorsqu'elles sont exposées au froid (365). L'administration d'Activin E recombinante chez des souris déficiente pour *Activin E* a induit une stéatose hépatique suggérant un rôle potentiel dans la régulation du métabolisme lipidique (366). Le schéma d'expression d'*Activin E* en contexte d'obésité semble paradoxal puisque d'un côté les niveaux plasmatiques sont augmentés chez les individus obèses et d'un autre côté les souris surexprimant *Activin E* sont protégées contre la prise de poids. D'autres études sont nécessaires pour identifier les mécanismes par lesquels Activin E induit la respiration découplée et pourquoi ces mécanismes ne protègent pas les individus obèses contre la prise de poids (221,358).

L'hépatokine adropin est encodé par le gène *ENHO*. Son expression est réduite en réponse à une présence accrue de lipides. Les niveaux d'adropin dans le sérum sont plus faible chez les humains souffrant d'obésité (367) et de diabète de type 2 (368). Chez la souris, l'expression de *ENHO* est réduite avec l'apparition de la NAFLD induite par une diète riche en gras (369). La déficience en *adropin* chez la souris exacerbe la stéatose hépatique avec une altération de la tolérance au glucose et de la sensibilité à l'insuline (369) et également l'augmentation de l'oxydation des AG hépatiques et systémiques (370). À l'inverse, les souris qui surexpriment *adropin* développent une stéatose hépatique plus modérée en réponse à la diète riche en gras, ainsi qu'une sensibilité à l'insuline et une tolérance au glucose améliorée et une oxydation des AG réduite (371). Des études ont montré que l'injection intra-péritonéale aigue d'adropin augmente la signalisation de l'insuline via la phosphorylation d'AKT et d'AS160 résultant en une meilleure translocation de GLUT4 au sarcolemme dans le muscle squelettique (372). Chez un modèle murin d'obésité et de résistante à l'insuline induit par une diète, l'injection d'adropin recombinante améliore l'homéostasie du glucose et est associée à une diminution de l'expression de gènes associés à la lipogénèse tels que *Scd1* (*sterol Co-A desaturase 1*) et *Fas* (*fatty acid synthase*) dans le foie et le TA (373). D'autres groupes ont montré que l'adropin augmente l'assimilation et l'oxydation du glucose par l'activation de la pyruvate deshydrogénase, l'enzyme limitante pour le transport du pyruvate mitochondrial et est associé à une diminution de la régulation de l'activité de CPT1 et d'autres protéines impliquées dans le métabolisme des lipides dont CD36 (372). Une expression et sécrétion élevée d'adropin semble améliorer la sensibilité à l'insuline et le métabolisme des glucides et des lipides tout en supprimant la stéatose hépatique. Ces données suggèrent que l'augmentation des

niveaux d'adropin dans le foie et le plasma de patients obèses pourrait être une approche thérapeutique pour la NAFLD et la résistance à l'insuline (221,358).

ANGPTL4 (*Angiopoietin-like 4*) est sécrétée par le foie et le TA, et joue un rôle dans la régulation du métabolisme des lipides (374). Des études ont montré qu'ANGPTL4 augmente la lipolyse des adipocytes via un processus qui est dépendant de son domaine de type fibrinogène C-terminal (375) et supprime l'activité de la LPL via son domaine superhélice N-terminal (376). Les niveaux d'AG libres et de TG plasmatiques sont alors augmentés et associés à une accumulation de gras ectopique dans le foie et le muscle squelettique (377). Les souris qui surexpriment *Angptl4* développent une dyslipidémie (378). Cependant, bien que les souris qui surexpriment ANGPTL4 ont une stéatose hépatique sévère, elles montrent une amélioration de la sensibilité à l'insuline hépatique et systémique. À l'inverse, les souris déficientes pour *Angptl4* montrent des niveaux faibles de TG plasmatiques à jeun et une augmentation de la clairance des VLDL (379,380). Les AG libres régulent positivement l'expression d'*Angptl4* par l'intermédiaire de l'activation de PPAR $\alpha$  dans le foie et PPAR $\gamma$  dans le TA (381). Ces données suggèrent que l'excès de lipides induit l'expression d'*Angptl4* et que les hauts niveaux circulants d'ANGPTL4 induisent la dyslipidémie. ANGPTL4 augmente l'inhibition de la gluconéogenèse médiée par l'insuline et diminue la production du glucose hépatique dans les hépatocytes primaires. Chez les humains, les niveaux d'ANGPTL4 corréler positivement avec la sensibilité à l'insuline (382). La réduction d'ANGPTL4 circulant par une délétion génétique chez la souris réduit les lipides sanguins, l'accumulation de lipides ectopiques dans le foie et le muscle, augmente la signalisation de l'insuline et améliore le contrôle glycémique. La thérapie avec des anticorps anti-ANGPTL4 chez des souris obèses et diabétiques restaure le phénotype métabolique favorable (383). Des études supplémentaires sont requises pour comprendre les différents effets d'ANGPTL4 sur l'action de l'insuline et étudier un potentiel rôle thérapeutique dans la dyslipidémie et du contrôle de la glycémie (221,358).

DPP4 (*Dipeptidyl peptidase-4*) est une sérine protéase ubiquitaire sécrétée par le foie. DPP4 circulante inactive les hormones incrétines GLP-1 (*glucagon like peptide-1*), le peptide inhibiteur gastrique (*gastric inhibitory peptide* ; GIP) et le peptide YY (PYY) (384). Les incrétines sont d'importants régulateurs de l'homéostasie du glucose dans tout le corps et jouent un rôle dans le contrôle de l'appétit et augmentent le temps de transit des aliments dans l'intestin. Par exemple, GLP-1 et GIP promeuvent la sécrétion de l'insuline et suppriment la sécrétion du glucagon résultant en la captation périphérique du glucose et la

réduction de la sortie du glucose hépatique (384). Chez l'Homme, les individus souffrants de NAFLD et de résistance à l'insuline possèdent des niveaux circulants élevés de DPP4 ainsi que de faibles niveaux sanguins de GLP-1 et de GIP (385,386). La surexpression foie-spécifique de DPP4 chez des souris nourries avec une diète riche en gras altère la tolérance au glucose. Encore une fois, ces observations sont associées à une diminution des niveaux circulants de GLP-1 (385). Le traitement d'hépatocytes primaires, d'adipocytes et de myotubes squelettiques avec DPP4 recombinante altère la sensibilité à l'insuline (384,387). Ces données suggèrent un effet direct de DPP4 sur le métabolisme des tissus périphériques. De plus, DPP4 induit la NAFLD principalement en augmentant la captation d'AG et leur stockage dans les hépatocytes (384). Des études ont montré que la délétion génétique (388) ou l'administration orale d'inhibiteur de DPP4 incluant vildagliptin (389) ou sitagliptin (390), améliore la stéatose hépatique et la tolérance au glucose suggérant l'action systémique et autocrine/paracrine de DPP4 (221,358). Son récepteur reste encore à être identifié.

Ectodysplasine A est une hépatokine associée à l'obésité et à la résistance à l'insuline (391). En effet, les niveaux d'ectodysplasine A sanguins et hépatiques sont augmentés dans des modèles murins d'obésité induite par une diète riche en gras ou des modèles génétiques. De plus, l'ARNm d'ectodysplasine A hépatique est augmenté chez les humains souffrant de NAFLD. Cette augmentation d'expression est associée à une réduction de l'action de l'insuline dans tout le corps. D'autre part, le traitement de cellules de muscle squelettique C2C12 ou l'injection d'ectodysplasine A chez la souris induisent une résistance à l'insuline musculaire associée à l'activation de JNK (391). Ces effets sont inversés lorsque ectodysplasine A est inactivé chez la souris mais sans effet sur l'action de l'insuline hépatique ou d'autres paramètres de l'homéostasie énergétique. Il existe donc une communication directe entre le foie et le muscle. Des études complémentaires sont nécessaires pour déterminer le rôle d'ectodysplasine A sur le métabolisme des lipides et confirmer la pertinence de cette protéine dans la NAFLD et le diabète de type 2 (221,391).

Fetuin A est une glycoprotéine sécrétée par le foie encodée par le gène *ASHG*. Fetuin A est positivement associée aux TG circulants, à la sévérité de la NAFLD et à la résistance à l'insuline chez les rongeurs et les humains (73,392). Le surplus de lipides induit le stress du RE qui active ERK1/2 (*extracellular signal-reduced kinases*) et JNK induisant la production de fetuin A (393). L'expression et la sécrétion hépatique de fetuin A sont régulées par FBXW7 (*F-box and WD repeat-domain 7*), une ubiquitine protéine ligase qui

dégrade fetuin A (394). Chez la souris et l'humain, FBXW7 est réprimé avec en parallèle des niveaux augmentés de fetuin A. Fetuin A induit la résistance à l'insuline selon plusieurs mécanismes (394). Par exemple, fetuin A inhibe l'activité de la tyrosine kinase du récepteur de l'insuline réduisant l'autophosphorylation et altérant la signalisation de l'insuline (395). D'autre part, fetuin A agit comme un ligand endogène de TLR4 avec l'activation de la signalisation de TLR4 par les AG libres saturés et l'induction de la résistance à l'insuline (396). L'interaction entre fetuin A et les AG libres prédit la résistance à l'insuline chez l'Homme (397). Dans le pancréas, fetuin A agit sur les cellules  $\beta$  avec une altération de la détection du glucose et donc une altération de la sécrétion d'insuline en réponse à l'inflammation et à l'accumulation de lipides lipotoxiques (398,399). La délétion totale de fetuin A chez la souris montre une amélioration de la sensibilité à l'insuline et une résistance à l'obésité induite par la diète. Ces données suggèrent un potentiel rôle thérapeutique d'antagonistes de fetuin A (400).

Fetuin B est encodé par le gène *FETUB* et est homologue à fetuin A à 22%. Fetuin B est augmenté chez les patients atteints de NAFLD (401,402), de diabète de type 2 (402), de diabète gestationnel (403) et corrèle positivement avec la résistance à l'insuline (404). L'administration de fetuin B à des myotubes et des hépatocytes induit la résistance à l'insuline. En revanche, l'injection de fetuin B chez des souris cause une intolérance au glucose globale mais pas de résistance à l'insuline, des résultats corroborés chez l'Homme (402,405). Ces données suggèrent un effet de fetuin B sur la capacité du glucose à gérer ses propres réserves indépendamment de l'insuline. De plus, des études montrent une altération par fetuin B de la première phase de la sécrétion de l'insuline stimulée par le glucose indiquant un rôle dans la fonction des cellules  $\beta$  (404). La suppression de la protéine fetuin B dans le foie par des ARN en épingle à cheveux (shARN) et la réduction de la sécrétion de fetuin B améliorent le contrôle glycémique chez des souris obèses résistantes à l'insuline. Ces données suggèrent un rôle de fetuin B dans la résistance à l'insuline induite par la NAFLD (402).

FGF21 (*Fibroblast Growth Factor 21*) régule le métabolisme systémique des lipides en réponse à la nourriture, aux maladies, à l'exercice physique et à l'exposition au froid (406). L'expression de FGF21 est augmentée par l'activation de PPAR $\alpha$  (407). Les niveaux de FGF21 sont élevés chez les individus atteints de NAFLD (408). FGF21 réduit la lipolyse du TA, augmente l'oxydation des AG, diminue les lipides hépatiques tels que les DAG, améliore la sensibilité à l'insuline et le contrôle glycémique. D'autre part, FGF21 réduit la

sécrétion hépatique de VLDL et accélère la disposition des VLDL dans le TA blanc et brun par l'intermédiaire d'une régulation augmentée de CD36 et LPL (409). La délétion de *Fgf21* chez la souris, de son récepteur FGFR-1c, ou du co-récepteur  $\beta$ -klotho, résulte en une plus grande adiposité, une stéatose hépatique, une résistance à l'insuline hépatique, une augmentation de la production de glucose dans le foie et une hyperglycémie (410). FGF21 promeut également la fonction des cellules  $\beta$ -pancréatiques et la sécrétion d'insuline (411). FGF21 est devenu un candidat thérapeutique potentiel pour le traitement du diabète de type 2 et du syndrome métabolique malgré que les tests cliniques chez l'Homme aient échoué à réduire le glucose sanguin (412).

Follistatin est un membre de la famille des TGF $\beta$ . Dans un premier temps, cette hépatokine a été identifiée pour son effet inhibiteur sur les follicules stimulant la production d'hormones dans la glande pituitaire (413). Par la suite, follistatin a été associée à la suppression de myostatine pour soutenir la croissance du muscle squelettique (100). Follistatin est augmenté chez les patients atteints de NAFLD ou de diabète de type 2 par l'intermédiaire de l'activation transcriptionnelle médiée par FOXO1 (414,415). D'autre part, les niveaux circulants de follistatin sont réduits par la perte de poids suivant la chirurgie bariatrique accompagné d'une amélioration de la sensibilité à l'insuline et du contrôle glycémique (415). Le lien direct entre les niveaux de follistatin et l'amélioration du contrôle glycémique n'est pas démontré. En revanche, follistatin promeut l'expression de cytokines pro-inflammatoires telles qu'IL-1 $\beta$ , impliqué dans la progression de la fibrose et le développement de la résistance à l'insuline dans le TA et le muscle squelettique (416–418). La surexpression de follistatin dans des hépatocytes ou chez la souris altère la signalisation dans le TAB, la suppression de la production du glucose médiée par l'insuline et la tolérance au glucose globale. La déficience en follistatin quant à elle améliore la sensibilité à l'insuline. Ces données montrent que follistatin est augmentée en contexte de NAFLD et avec la capacité de promouvoir l'inflammation, la résistance à l'insuline et l'intolérance au glucose (221,415).

HFREP1 (*Hepatocyte-derived fibrinogen-related protein 1*), ou hepassocin ou protéine de type fibrinogène-1, est sécrétée par les hépatocytes et est connue pour promouvoir la croissance et la prolifération cellulaire (129). HFREP1 est élevée chez les individus atteints de NAFLD et NASH, et ces niveaux plasmatiques corrént positivement avec les niveaux de glucose sanguin et la résistance à l'insuline (419,420). L'expression hépatique de HFREP1 est augmentée chez les souris développant une NAFLD induite par

une diète riche en gras, suggérant un rôle des lipides circulants sur l'expression de HFREP1. De plus, le palmitate augmente de façon dose dépendante l'expression de HFREP1. L'expression de HFREP1 dépendante des lipides est médiée par le stress du RE et l'activation de P38 et CEBP $\beta$  (421). Le blocage pharmacologique de cette voie inhibe l'expression de HFREP1 et restaure partiellement l'action de l'insuline. HFREP1 promeut la lipogénèse via l'activation d'ERK1/2 indiquant un mécanisme de rétroaction avec la NAFLD (419). D'autre part, HFREP1 cause la résistance à l'insuline dans des cellules musculaires C2C12 qui est médiée par une diminution de la phosphorylation d'AMPK et une augmentation de l'activation de JNK dépendant du récepteur du facteur de croissance épidermal et de la phosphorylation de FOXO1 (419,421). L'administration de HFREP1 recombinante ou la surexpression de HFREP1 induit de la résistance à l'insuline dans le foie et le muscle squelettique. En revanche, la délétion de HFREP1 dans le foie protège contre la résistance à l'insuline induite par la diète (419,422). La réduction des niveaux de HFREP1 pourrait être une stratégie pour améliorer la résistance à l'insuline (277,358).

HMGB1 (*High mobility group box 1 protein*) a été découverte dans un premier temps comme une protéine qui se lie aux nucléosomes pour stabiliser la structure de l'ADN (acide désoxyribonucléique) et moduler la transcription (423). Plus récemment, HMGB1 a été identifié comme une protéine sécrétée par les hépatocytes (424). L'expression et la sécrétion de HMGB1 sont augmentées en contexte de NAFLD en réponse à l'augmentation de la quantité d'AG libres (424). HMGB1 sécrétée initie la signalisation de TLR4 avec activation de NF- $\kappa$ B induisant l'inflammation dans les hépatocytes. Ainsi, la signalisation entre HMGB1 et TLR4 pourrait contribuer à la résistance à l'insuline dans la NAFLD (425). Chez le rat, bloquer HMGB1 résulte en une diminution des effets lipotoxiques dans les hépatocytes et protège contre la progression de la NAFLD. Les études chez l'Homme ne montrent pas d'association entre les niveaux de HMGB1 et la sévérité histologique de la NAFLD (424,426).

Inhibin  $\beta$ E est un membre de la famille TGF $\beta$ . Chez les rongeurs et chez l'Homme, inhibin  $\beta$ E est positivement associée avec l'IMC et la résistance à l'insuline (427,428). La délétion d'*inhibin  $\beta$ E* dans le foie de souris obèses *db/db* atténue le gain de masse graisseuse avec une meilleure oxydation du gras dans tout le corps (427). En revanche, aucun phénotype métabolique n'a été observé chez les souris déficiente en *inhibin  $\beta$ E* (429). Des travaux additionnels sont nécessaires pour déterminer si Inhibin  $\beta$ E augmente

réellement l'oxydation du gras et si inhiber l'action d'inhibin  $\beta$ E peut avoir un potentiel thérapeutique dans la NAFLD et l'obésité (277).

LECT2 (*Leukocyte cell-derived chemotaxin 2*) est une protéine de 16kDa initialement décrite comme une molécule chimiotactique pour attirer les neutrophiles (430). Chez l'humain, l'expression de LECT2 est positivement corrélée avec le poids et la résistance à l'insuline (431,432). La délétion totale de LECT2 chez la souris augmente la phosphorylation d'AKT stimulée par l'insuline dans le muscle squelettique (64,431). D'autre part, l'administration de protéine recombinante LECT2 active JNK et inhibe la signalisation à l'insuline via une augmentation de la phosphorylation de la sérine 307 d'IRS1 (64,431). De manière intéressante, l'inhibition de DPP4 par des agents pharmacologiques améliore le métabolisme du glucose chez la souris, avec en parallèle une réduction de la quantité de LECT2 hépatique et ce, via l'activation d'AMPK (*AMP-activated protein kinase*) et la suppression de l'activité de JNK (433). Il est possible que DPP4 régule l'expression de LECT2 indiquant probablement une communication entre les hépatokines dans un contexte de NAFLD (277,431).

PEDF (*Pigment epithelium-derived factor*) est une sérine protéase non-inhibitrice. PEDF a d'abord été identifiée comme une protéine sécrétée par les cellules épithéliales de la rétine. PEDF est également hautement exprimée et sécrétée par le foie et le TA (434). L'expression de PEDF dans le foie et ses niveaux circulants sont augmentés chez les individus obèses présentant une résistance à l'insuline et une NAFLD. La tendance est inversée lorsque les individus perdent du poids (435,436). Chez les souris, PEDF est impliquée dans le développement de la résistance à l'insuline et de l'intolérance au glucose. En effet, PEDF augmente l'activité de JNK et ERK1/2 dans le muscle squelettique et le foie, ainsi que l'activité de NF- $\kappa$ B dans les adipocytes avec pour conséquence une réduction de la signalisation de l'insuline (437,438). L'administration de PEDF recombinante ou la surexpression de *Pedf* dans le TA des souris augmente la lipolyse du TA par l'intermédiaire de son interaction avec ATGL (*adipose triglycerides lipase*), l'enzyme limitante pour l'hydrolyse intracellulaire des TG. Ces effets sont accompagnés d'une augmentation de l'accumulation de céramides et de DAG dans le foie et le muscle (437–439). Ces résultats sont inversés lorsque PEDF est neutralisée avec des anticorps monoclonaux. Les niveaux circulants de PEDF corrélerent avec la stéatose hépatique et la résistance à l'insuline. Chez la souris, la surexpression foie-spécifique de *Pedf* inverse l'accumulation de lipides hépatiques suggérant une lipolyse intrahépatique plus importante et une évolution plus

faible vers la NASH plus faible (440–442). Ces données suggèrent que la production de PEDF en réponse à la NAFLD est destinée à une action dans les tissus périphériques dans lesquels PEDF promeut la résistance à l'insuline et la dyslipidémie, plutôt que dans le foie (277).

RBP4 (*Retinol binding protein 4*) est une protéine sécrétée par le foie et le TA qui transporte la vitamine A sous la forme de rétinol (443). Chez l'humain, les niveaux circulants de RBP4 sont élevés en contexte de NAFLD, de résistance à l'insuline et de diabète de type 2. D'autre part, la quantité de RBP4 dans le sang diminue en réponse à la perte de poids induite par un régime alimentaire, à la chirurgie bariatrique et à l'exercice (444–449). La surexpression de RBP4 chez la souris induit de l'inflammation et de la résistance à l'insuline dans le TA causé par une activation des voies JNK et TLR4. La déplétion de *Rbp4* quant à elle augmente la sensibilité à l'insuline (450,451). Cependant, lors de la surexpression foie-spécifique de *Rbp4* chez la souris, le contrôle glycémique n'est pas affecté malgré une augmentation de RBP4 en circulation (452). Des études complémentaires sont requises pour déterminer le rôle de RBP4 dans la NAFLD et le diabète de type 2 (277).

SeP (*Selenoprotein P*) est une hépatokine dont les niveaux circulants sont augmentés chez l'humain en réponse au diabète de type 2, à la résistance à l'insuline et au niveau de glucose dans le sang (453–455). De la même façon chez la souris, l'expression hépatique de *SeP* et sa sécrétion sont augmentées en réponse à une diète riche en gras, à la NAFLD et au diabète de type 2 (453,456). L'expression et la sécrétion de *SeP* sont aussi augmentées en réponse au stress du RE ainsi qu'à l'activation de JNK par la stimulation de TLR4 (457). Chez la souris, l'administration de *SeP* recombinante cause la résistance à l'insuline (458). La présence de *SeP* dans des cellules HepG2 altère la phosphorylation du récepteur de l'insuline suggérant une inhibition directe de l'autophosphorylation. D'autre part, *SeP* altère la sécrétion d'insuline en réponse au glucose dans les cellules  $\beta$  pancréatiques (459). Cet effet est inversé lorsque *SeP* circulante est neutralisée par des anticorps monoclonaux. Chez la souris, la déplétion de *SeP* améliore la sensibilité à l'insuline systémique et la tolérance au glucose. Chez des souris diabétiques, l'utilisation d'anticorps monoclonaux pour neutraliser la protéine en circulation améliore la sécrétion de l'insuline et le contrôle glycémique. Ces données suggèrent un potentiel rôle thérapeutique de *SeP* (458,459).

SHBG (*Sex hormone-binding protein*) est une protéine connue comme transporteur des stéroïdes sexuels (460). Les niveaux hépatiques et circulants de SHBG sont diminués

en contexte de NAFLD et les niveaux plasmatiques de SHBG prédisent négativement la résistance à l'insuline et l'hyperinsulinémie (461–464). De plus, la faible quantité de SHBG est associée de manière indépendante à l'obésité. La perte de poids qui suit la chirurgie bariatrique est associée à une augmentation de SHBG en circulation. Des études dans des HepG2 suggèrent que la diminution d'expression de SHBG en contexte de NAFLD est due à l'inflammation et à l'augmentation de  $TNF\alpha$  en réponse à l'activation de JNK et NF- $\kappa$ B (465). In vitro, l'insuline promeut la production de SHBG (466). De plus, les individus souffrant de diabète de type 1 ont une association plus marquée entre les niveaux d'insuline et de SHBG que les patients atteints de diabète de type 2 (463). Ainsi, il est possible que la diminution des niveaux de SHBG précède la résistance à l'insuline hépatique et exacerbe l'accumulation de lipides. Ces données décrivent une forte association entre de faibles niveaux de SHBG dans le foie et le sang et l'obésité, la NAFLD et la résistance à l'insuline. Les mécanismes impliquant SHBG et le contrôle glycémique ne sont pas connus (467,468).

Dans les dernières années, une attention particulière a été donnée aux facteurs sécrétés qui sont les acteurs majeurs de la communication entre les différents tissus. Le foie est un organe sécrétoire clé dans la régulation de l'homéostasie métabolique. Son sécrétome représente un intérêt considérable dans les pathologies métaboliques. Malgré les nombreuses hépatokines identifiées ayant un rôle dans le métabolisme des lipides et du glucose, de la résistance à l'insuline et de l'inflammation, aucune d'elle n'est actuellement utilisée comme biomarqueur ou cible thérapeutique de l'obésité et/ou de ses comorbidités et notamment de la NAFLD/NASH. De nombreuses hépatokines, d'un intérêt majeur pour le diagnostic et le traitement de la NAFLD/NASH et des pathologies associées, restent encore à être découvertes.

**Tableau 1: Les hépatokines associées avec la NAFLD et la résistance à l'insuline.**

Hepatokine	Gène (souris / Homme)	Expression dans la NAFLD	Contribution à la NAFLD	Contribution à la tolérance au glucose/résistance à l'insuline
Activin E	<i>Inhbe</i> / <i>INHBE</i>	↑	↓ la stéatose	La surexpression d'Activin E prévient l'intolérance au glucose chez les rongeurs
Adropin	<i>Enho</i> / <i>ENHO</i>	↓	Supprime la lipogenèse	Améliore la sensibilité à l'insuline; stimule la signalisation de l'insuline dans le muscle squelettique
ANGPTL4	<i>Angptl4</i> / <i>ANGPTL4</i>	↑	Promeut l'accumulation de lipides hépatiques	Effets controversés : améliore la sensibilité à l'insuline en diminuant la production hépatique de glucose; induit la résistance à l'insuline dans le foie, le muscle squelettique, et le TA
DPP4	<i>Dpp4</i> / <i>DPP4</i>	↑	↑ CD36 dans le foie, susceptible d'augmenter les lipides	Inhibe les niveaux d'incrétines et altère la sécrétion d'insuline
Ectodysplasin	<i>EDA</i>	↑	Inconnue	Induit la résistance à l'insuline dans le muscle squelettique via l'activation de JNK
Fetuin A	<i>Ashg</i> / <i>ASHG</i>	↑	Inconnue	Promeut la résistance à l'insuline
Fetuin B	<i>Fetub</i> / <i>FETUB</i>	↑	Inconnue	Promeut la résistance à l'insuline, altère la tolérance au glucose
FGF21	<i>Fgf21</i> / <i>FGF21</i>	↑	↑ l'oxydation hépatique des lipides	Augmente la sensibilité à l'insuline
Follistatin	<i>Fst</i> / <i>FST</i>	↑	Promeut la production $IL-1\beta$	Inconnue
HFREP1	<i>Fgl1</i> / <i>FGL1</i>	↑	Promeut la NAFLD, augmente la lipogenèse	Induit la résistance à l'insuline dans le muscle squelettique
HMGB1	<i>Hmgb1</i> / <i>HMGB1</i>	↑	Bloquer HMGB1 protège contre la NAFLD	Inconnue
Inhibin $\beta E$	<i>Inbe</i>	↑ par l'obésité	Inconnue	Inconnue
LECT2	<i>Lect2</i> / <i>LECT2</i>	↑	Inconnue	Promeut la résistance à l'insuline dans le muscle squelettique; altère la signalisation de l'insuline
PEDF	<i>Serpinf1</i> / <i>SERPINF1</i>	↑	Interagit avec ATGL pour augmenter la lipolyse; sa délétion promeut la stéatose	Promeut la résistance à l'insuline dans le muscle squelettique
RBP4	<i>Rbp4</i> / <i>RBP4</i>	↑	Inconnue	
Selenoprotein P	<i>Selenop</i> / <i>SELENOP</i>	↑	Inconnue	Induit la résistance à l'insuline dans le muscle squelettique et le foie; inhibe le récepteur de l'insuline; altère la sécrétion de l'insuline par les cellules $\beta$
SHBG	<i>Shbg</i> / <i>SHBG</i>	↓	Supprime la lipogenèse dans le foie; exacerbe la stéatose	Inconnue

## Résumé

La NAFLD est une pathologie de plus en plus répandue dans les pays développés. Cette pathologie, autrefois diagnostiquée chez les individus atteints d'obésité, apparaît désormais chez des personnes non-obèses. La consommation excessive de glucose et fructose notamment sous la forme de boissons sucrées est suggérée comme la cause principale de l'augmentation de l'incidence de la NAFLD chez des personnes d'apparence saine. Dans les premiers stades, la NAFLD est une pathologie très souvent silencieuse, sans symptômes apparents. Son diagnostic est donc dans la plupart des cas accidentel. Actuellement, le diagnostic le plus fiable de la NAFLD est la biopsie, une méthode invasive qui ne peut pas être pratiquée de manière routinière chez les sujets à risque de NAFLD. Ainsi, les tests non invasifs sont davantage utilisés en clinique pour estimer la NAFLD. Les méthodes d'imageries sont de plus en plus fiables mais sont généralement très coûteuses. D'importants efforts sont déployés sur l'identification de nouveaux biomarqueurs pour le développement de nouveaux outils de diagnostic fiables permettant de différencier les différents stades cliniques de la NAFLD et suivre son évolution dans le temps de façon non-invasive. Parmi les hépatokines identifiées dans les dernières années, de nombreuses montrent des rôles dans la régulation du métabolisme des lipides, du glucose, et de l'insuline dans le foie et dans les tissus périphériques. Malgré des potentiels prometteurs pour certaines d'entre elles, aucune de ces hépatokines n'est actuellement utilisée dans le diagnostic ou le traitement de la NAFLD et/ou de l'obésité. Les connaissances sur les hépatokines sont encore limitées et nécessitent des études plus approfondies pour comprendre les mécanismes gouvernant cette communication inter-tissulaire. Les hépatokines représentent d'importants contributeurs aux maladies métaboliques et de potentielles cibles pour la prévention et le traitement de ces pathologies (358). Ainsi, la découverte de nouvelles hépatokines et de leurs fonctions biologiques offre de nouvelles perspectives quant aux stratégies de diagnostics et d'intervention dans les pathologies métaboliques.

# Problématique et objectifs de travaux

## Problématique

L'obésité, devenue une pandémie mondiale dont la prévalence ne cesse d'augmenter chaque année, est une préoccupation majeure des services de santé. En effet, l'accumulation excessive de graisse dans la cavité abdominale plus particulièrement est associée à de nombreuses pathologies incluant la NAFLD, le diabète de type 2, la dyslipidémie et les maladies cardiovasculaires. La NAFLD est elle-même fortement associée au diabète de type 2, aux dyslipidémies et aux maladies cardiovasculaires.

Le foie est un organe essentiel dans la régulation de l'homéostasie systémique. Dans un contexte de NAFLD, le foie est gorgé de lipides ayant pour conséquence une altération du métabolisme hépatique avec notamment l'apparition du stress du RE et d'inflammation. Il existe une boucle de rétroaction liant l'accumulation de lipides, le stress du RE et l'inflammation. Dans un stade plus avancé de NASH, il y a apparition de fibrose.

Le foie sécrète des facteurs, nommés hépatokines, qui ont la capacité d'altérer le métabolisme des tissus périphériques. Ces facteurs ont un rôle potentiel dans le contrôle de l'homéostasie systémique. En contexte de NAFLD, la sécrétion de ces facteurs est altérée. Plusieurs hépatokines ont été identifiées et caractérisées au cours des dernières années dans un contexte d'obésité et de NAFLD. Ces hépatokines jouent des rôles dans le métabolisme du glucose, le métabolisme des lipides, ou encore l'inflammation au niveau du foie mais également d'autres tissus tels que le tissu adipeux, le cœur, le pancréas et le muscle. Cependant, il reste encore de très nombreuses hépatokines à identifier et caractériser.

À ce jour, les méthodes de diagnostics et de traitements de la NAFLD sont limitées. L'évaluation précise du stade de NAFLD est réalisée avec une biopsie hépatique, une méthode invasive. De plus, aucun biomarqueur sanguin spécifique à la NAFLD n'existe actuellement. Il n'y a pas non plus de traitement spécifique à la NAFLD et les médications utilisées ciblent généralement d'autres pathologies associées à la NAFLD. Ainsi, les hépatokines représentent de potentielles biomarqueurs de la santé hépatique ou de potentielles cibles thérapeutiques pour le traitement de l'obésité et des pathologies qui lui sont associées.

## Objectifs des travaux

- 1) Identifier de nouvelles protéines sécrétées par le foie et modulées en contexte d'obésité.
- 2) Étudier les mécanismes impliqués dans la régulation de *Tsk* et son impact sur l'homéostasie systémique.

## Objectifs spécifiques

- 1.a) Identifier de nouvelles hépatokines modulées en contexte d'obésité.
- 1.b) Valider la modulation de *Tsk* en contexte d'obésité.
- 2.a) Déterminer les facteurs régulant l'expression et la sécrétion de TSK.
- 2.b) Étudier l'impact de la perte ou de la surexpression de *Tsk* in vivo dans différents modèles de souris.
- 2.c) Déterminer si TSK peut avoir un rôle potentiel chez l'humain.

# Chapitre 1

## THE HEPATOKINE TSUKUSHI IS RELEASED IN RESPONSE TO NAFLD AND IMPACTS CHOLESTEROL HOMEOSTASIS

Mathilde Mouchiroud<sup>1</sup>, Étienne Camiré<sup>1</sup>, Manal Aldow<sup>1</sup>, Alexandre Caron<sup>2</sup>, Éric Jubinville<sup>1</sup>, Laurie Turcotte<sup>1</sup>, Inès Kaci<sup>1</sup>, Marie-Josée Beaulieu<sup>1</sup>, Christian Roy<sup>1</sup>, Sébastien M. Labbé<sup>1,3</sup>, Thibaut V. Varin<sup>1,4</sup>, Yves Gélinas<sup>1</sup>, Jennifer Lamothe<sup>1</sup>, Jocelyn Trottier<sup>5</sup>, Patricia Mitchell<sup>1</sup>, Frédéric Guénard<sup>4</sup>, William T. Festuccia<sup>6</sup>, Philippe Joubert<sup>1</sup>, Christopher F. Rose<sup>7</sup>, Constantine J. Karvellas<sup>8</sup>, Olivier Barbier<sup>5</sup>, Mathieu C. Morissette<sup>1,9</sup>, André Marette<sup>1,4,9</sup> and Mathieu Laplante<sup>1,9,10\*</sup>

<sup>1</sup>Centre de recherche de l'Institut universitaire de cardiologie et de pneumologie de Québec - Université Laval (CRIUCPQ), 2725 Chemin Ste-Foy, Québec, QC, Canada, G1V 4G5

<sup>2</sup>Division of Hypothalamic Research, Department of Internal Medicine, The University of Texas Southwestern Medical Center, 5323 Harry Hines Boulevard, Dallas, TX, USA, 75390

<sup>3</sup>IPS Thérapeutique, 3035 Boulevard Industriel, Sherbrooke, QC, Canada, J1L 2T9

<sup>4</sup>Institut sur la nutrition et les aliments fonctionnels (INAF), Université Laval, 2440 Boulevard Hochelaga Suite 1710, Québec, QC, Canada, G1V 0A6

<sup>5</sup>Laboratory of Molecular Pharmacology, Endocrinology-Nephrology axis, Centre de recherche du Centre Hospitalier Universitaire de Québec, & Faculty of Pharmacy, Université Laval, 2705 Boulevard Laurier, Québec, QC, Canada, G1V 4G2

<sup>6</sup>Department of Physiology and Biophysics, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil, 05508-000

<sup>7</sup>Hepato-Neuro Laboratory, Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM), 900, rue Saint-Denis - Tour Viger R08.422, Montréal, QC, Canada, H2X 0A9

<sup>8</sup>Division of Gastroenterology (Liver Unit), Department of Critical Care Medicine, School of Public Health Science, University of Alberta, 1-40 Zeidler Ledcor Building, 8540 - 112 Street, Edmonton, AB, Canada, T6G 2X8,

<sup>9</sup>Département de Médecine, *Université Laval*, 1050 avenue de la Médecine, Québec, QC, Canada, G1V0A6

<sup>10</sup>Centre de recherche sur le cancer de l'Université Laval, Université Laval, 9 rue McMahon, Québec, QC, Canada, G1R 3S3

**« Copyright © 2019 American Society for Clinical Investigation  
From JCI Insight, Vol. 4, 2019; e129492  
Reprinted with permission from *The American Society for Clinical Investigation.*»**

Article publié dans *JCI Insight* 4 : e129492, 2019

## **Avant-propos**

Cet article présente l'identification et la caractérisation de TSK, une nouvelle hépatokine impliqué dans l'homéostasie du cholestérol. L'ensemble de ce travail a été réalisé sous la direction du Dr. Mathieu Laplante. Cette étude implique mon entière participation quant à la réalisation de l'ensemble des étapes menant à l'aboutissement de ces travaux, soit la planification, les décisions relatives aux mesures effectuées, la mesure des variables plasmatiques et tissulaires et l'écriture du manuscrit. Travaillant sur une nouvelle protéine, de nombreux résultats ont été insérés en tant que matériel supplémentaire ou n'ont pas pu être intégrés dans l'article. Suite aux corrections du directeur, l'article a été révisé par l'ensemble des coauteurs et a été soumis aux éditeurs de la revue *JCI Insight*. Cet article a été accepté pour fin de publication en août 2019 et publié en octobre 2019.

## Résumé

La stéatose hépatique non alcoolique (NAFLD) prévaut dans l'obésité et est liée à plusieurs complications de santé incluant la dyslipidémie et l'athérosclérose. Comment exactement la NAFLD induit la dyslipidémie athérogène pour promouvoir les maladies cardiovasculaires reste encore à déterminer. Ici, nous identifions Tsukushi (TSK) comme une hépatokine induite en réponse à la NAFLD. Nous montrons que le stress du réticulum endoplasmique et l'inflammation favorisent l'expression et la libération de TSK chez la souris. Chez l'homme, l'expression hépatique de TSK est également associée à la stéatose, et ses niveaux circulants sont nettement augmentés chez les patients souffrant d'insuffisance hépatique aiguë induite par l'acétaminophène (ALF), une condition liée à une inflammation hépatique sévère. Chez ces patients, des taux sanguins élevés de TSK étaient associés à une diminution de la survie sans greffe à la sortie de l'hôpital, ce qui suggère que TSK pourrait avoir une signification dans le pronostic. Des études de gain et de perte de fonction chez la souris ont révélé que TSK a un impact sur l'homéostasie systémique du cholestérol. TSK réduit le cholestérol HDL circulant, abaisse la capacité d'efflux de cholestérol et diminue la conversion du cholestérol en acide biliaire dans le foie. Nos données identifient l'hépatokine TSK comme un biomarqueur sanguin du stress hépatique qui pourrait lier la NAFLD au développement de la dyslipidémie athérogène et de l'athérosclérose.

## Abstract

Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) prevails in obesity and is linked to several health complications including dyslipidemia and atherosclerosis. How exactly NAFLD induces atherogenic dyslipidemia to promote cardiovascular diseases is still elusive. Here, we identify Tsukushi (TSK) as a hepatokine induced in response to NAFLD. We show that both endoplasmic reticulum stress and inflammation promote the expression and release of TSK in mice. In humans, hepatic TSK expression is also associated with steatosis, and its circulating levels are markedly increased in patients suffering from acetaminophen-induced acute liver failure (ALF), a condition linked to severe hepatic inflammation. In these patients, elevated blood TSK levels were associated with decreased transplant-free survival at hospital discharge, suggesting that TSK could have a prognostic significance. Gain- and loss-of-function studies in mice revealed that TSK impacts systemic cholesterol homeostasis. TSK reduces circulating HDL cholesterol, lowers cholesterol efflux capacity, and decreases cholesterol-to-bile acid conversion in the liver. Our data identify the hepatokine TSK as a blood biomarker of liver stress that could link NAFLD to the development of atherogenic dyslipidemia and atherosclerosis.

## Introduction

Obesity has reached epidemic proportions worldwide (1-3). Excessive accumulation of white adipose tissue, especially in the abdominal cavity, is a major risk factor for several diseases including type 2 diabetes, insulin resistance, dyslipidemias, hypertension and cardiovascular diseases (4, 5). Abdominal obesity is also tightly linked to the development of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD), a wide spectrum of liver conditions, which ranges from simple steatosis to non-alcoholic steatohepatitis (NASH), a disease characterized by hepatic inflammation and fibrosis that can progress to cirrhosis and hepatocellular carcinoma (6, 7). NAFLD is one of the most important causes of liver disease worldwide, and its prevalence is constantly rising (8, 9).

In addition to its direct impact on liver health, NAFLD is suspected to play an active role in the development of obesity-related metabolic disorders. Links between NAFLD and dyslipidemias, glucose intolerance, insulin resistance, type 2 diabetes and cardiovascular diseases have been reported (10-14). In fact, cardiovascular complications represent the leading cause of death in patients with NAFLD (15). How exactly NAFLD contributes to these diseases is unclear. Recent advances suggest that the liver may impact on metabolism through the secretion of specific proteins. These proteins, often termed as hepatokines, are secreted by the liver and mediate inter-organ communication through autocrine, paracrine and endocrine signaling (8, 16). Several hepatokines have been identified including Fetuin A (17), Fetuin B (18), Fibroblast growth factor 21 (FGF21) (19), Fibrinogen-like protein 1 (FGL1, also known as Hepassocin) (20), Follistatin (FST) (21-23), Inhibin  $\beta$ E (INHBE) (24, 25), Leukocyte-cell derived chemotaxin 2 (LECT2) (26), Retinol-binding protein 4 (RBP4) (27, 28) and Selenoprotein P (SEPP1) (29). These hepatokines, whose expression is affected by conditions such as obesity and NAFLD, impact on various organs to modulate glucose metabolism, lipid homeostasis and inflammation. Studies in mice and humans indicate that altered hepatokine secretion promotes glucose intolerance, insulin resistance, NAFLD progression and cardiovascular diseases (8, 16), making these proteins attractive targets to alleviate obesity-related metabolic disorders.

The list of hepatokines impacting on metabolism has expanded in recent years. Nevertheless, because of the importance of the liver in the regulation of systemic homeostasis, it is likely that this organ communicates its state through effectors that are not yet characterized (18, 30). Here, using a comprehensive analytical platform, we report the identification of TSK as a protein produced and secreted by the liver. We find that hepatic

*Tsk* expression and circulating levels are elevated in various obese mouse models and strongly induced in response to lipid deposition in the liver. The presence of endoplasmic reticulum stress (ER) and inflammation, both common in NAFLD, promotes the expression and the release of TSK. In human, hepatic TSK expression correlates with steatosis and high plasma TSK levels were found in patients suffering from acetaminophen-induced acute liver failure (ALF), a condition linked to severe inflammation and liver damage. In these patients, elevated TSK levels in serum were associated with decreased transplant-free survival at hospital discharge. Studies in mice revealed that TSK does not affect NAFLD development and progression but rather plays a role in the regulation of systemic cholesterol homeostasis. Here, we report that TSK lowers circulating HDL-cholesterol levels, reduces cholesterol efflux capacity and cholesterol conversion to bile acids (BA) in the liver. We propose a new model in which TSK is released in response to NAFLD to limit reverse cholesterol transport. Our data identify the hepatokine TSK as a new blood biomarker of liver stress that could link NAFLD to the development of atherogenic dyslipidemia and atherosclerosis.

## Results

### **TSK is a hepatokine induced by obesity.**

In order to identify new secreted factors primarily produced by the liver whose expression is deregulated in obesity, we have implemented a simple analytical platform using BioGPS (<http://biogps.org>), a centralized gene-annotation portal that enables researchers to access distributed gene annotation resources (31, 32). BioGPS hosts a reference plugin that displays gene expression patterns from more than 90 mouse tissues and cell types (33). These microarray data, available through NCBI's Gene Expression Omnibus (accession number GSE10246), can be used to compare the expression profile of any given gene between a broad panel of tissues. To establish a list of liver-specific genes, we first interrogated the database to extract all the genes showing an expression pattern correlating with Albumin, a gene selectively expressed in hepatocytes (Fig.1A). The correlation cut-off was arbitrary fixed at 0.80. This led to the identification of 306 liver-specific genes (Table S1), including several established hepatokines. All the genes were then scored to sort out the best candidates. Because we were interested in secreted proteins, priority was given to genes coding for proteins with a secretory signal peptide. Conserved proteins with uncharacterized relation to obesity were also prioritized. This analysis led to the identification of 17 high priority candidates (Table S2). To identify which of these genes are affected by obesity, we next measured their expression in the liver of lean and obese (*db/db*) mice by quantitative PCR (qPCR). Of the 17 candidates, 7 were differentially expressed between lean and obese mice, namely *Cpn1*, *Gdf2*, *Habp2*, *Inhbc*, *Mia2*, *Tsk* and *Vwce* (Fig.S1A).

*Tsukushi* (*Tsk*) is one candidate gene that caught our attention. As shown in Figure 1B, its expression is specifically elevated in mouse liver. Our analysis revealed that hepatic *Tsk* was the candidate gene showing the most important difference in expression between lean and obese mice (Fig.S1A). Specifically, *Tsk* expression was induced more than 8 times in the liver of *db/db* mice (Fig.1C). Following up on this finding, we found that *Tsk* expression was also significantly increased in the liver of other obese mouse models such as *ob/ob* mice and mice fed a high-fat diet (HFD) (Fig.1D-E). Of note, we observed that the elevation in *Tsk* expression was not as profound in HFD-fed mice compared to genetically obese mice, suggesting that the severity of obesity may be an important factor in the regulation of *Tsk* expression (Fig.S1B to D). Despite these differences, our results identify TSK as a factor primarily expressed in the liver whose expression is induced in response to obesity.

### **TSK is a secreted protein enriched in the plasma of severely obese mice.**

TSK is a protein that carries an N-terminal signal peptide and 10 leucine rich repeat (LRR) domains in its central region (Fig.1F). This protein is conserved throughout evolution, with homologs found from human to zebrafish (Fig.S1E). TSK is an atypical member of the small leucine-rich proteoglycan (SLRP) family, a group of 18 proteins that bind to components of the extracellular matrix to modulate the action of several signaling pathways (34). TSK was shown to control developmental processes by modulating bone morphogenetic protein (BMP) (35-38), Wnt (39), fibroblast growth factor (FGF) (37) and TGF $\beta$  signaling pathways (40, 41).

The presence of a signal peptide in the N-terminal section of TSK indicates that the protein may be secreted. Studies performed in chick and xenopus support this possibility (35, 36, 38). To directly test whether mammalian TSK is also secreted, TSK was overexpressed in 293T cells and culture medium was collected for western blot analysis (Fig.1G). TSK was detected in the culture media of overexpressing cells, thus confirming the secreted nature of the protein. Mutated TSK lacking the signal peptide ( $\Delta$ -TSK) could not be secreted in the same system, indicating the importance of this domain for the release of the protein in the extracellular compartment (Fig.1H). To directly test the ability of the liver to secrete TSK in vivo, mice were infected with adeno-associated viruses serotype 8 (AAV8) coding for either a control green fluorescent protein (GFP) or full length TSK. As expected, we detected high expression of TSK in the liver of mice injected with AAV8-TSK (Fig.1I and S1F). Importantly, we also found high levels of the protein in the plasma, thus confirming the ability of the liver to produce and secrete TSK in the circulation (Fig.1J).

As discussed above, *Tsk* is highly expressed in the liver and its expression is induced in obese mice. To determine whether such increase translates into a rise in circulating TSK, plasma collected from lean and obese mice was analyzed by western blotting. Circulating TSK levels were barely detectable in lean animals but were high in genetically obese mice (Fig.1K and 1L). Despite those striking results observed in severely obese mice, TSK could not be detected in the plasma of HFD-fed animals (data not shown). As shown above, the rise in hepatic *Tsk* expression was less severe in HFD-fed mice compared to genetically obese animals (Fig.1C to 1E), suggesting that a certain threshold of hepatic TSK production may have to be reached to allow the detection of the protein in the blood using our antibody. Nevertheless, we can conclude from these results that TSK is a secreted protein that circulates at high levels in severely obese animals.

### **Hepatic *Tsk* expression correlates with NAFLD in multiple mouse models.**

NAFLD is a condition that prevails in obesity (9). To define whether NAFLD impacts on *Tsk* expression, hepatic triglyceride levels were measured in lean and obese mice and correlations with *Tsk* mRNA were calculated. As shown in Figure 2A to 2C, we observed a strong positive relationship between liver triglyceride content and *Tsk* expression in all the models tested, suggesting a prominent role of liver fat accumulation in promoting *Tsk* expression.

We next wanted to examine whether NAFLD per se could, independently of obesity, promote *Tsk* expression and secretion. Two different approaches were used to test this hypothesis. We first fed mice a Methionine and Choline-Deficient (MCD) diet for 21 days. This approach induced liver steatosis despite significant weight loss (Fig.2D-E). As observed in obese mice, we found an elevation in both hepatic *Tsk* expression and circulating TSK levels in mice fed the MCD diet (Fig.2F-G). A positive correlation was also observed between liver triglycerides and *Tsk* mRNA (Fig.2H). Interestingly, switching back MCD diet-fed mice to a normal diet for 3, 6 or 12 days was sufficient to reverse steatosis and normalize hepatic *Tsk* expression and secretion (Fig.2I to 2L). Again, a positive link between liver triglycerides and *Tsk* mRNA was found in this experiment (Fig.S2A). In a second approach, mice were treated with the synthetic liver X receptor (LXR) agonist T0901317 for 4 days to induce acute liver steatosis without weight gain, as shown before (42). In this model, we also found a clear positive association between liver triglycerides and *Tsk* expression (Fig.S2B to S2D). These results indicate that NAFLD, independently of obesity, promotes hepatic *Tsk* expression and secretion.

Recently, Wang et al. reported that hepatic *Tsk* expression and secretion are highly induced in response to cold exposure and injection with the  $\beta$ 3 adrenergic receptor agonist CL316243 (43). These observations were confirmed here (Fig.2M). It is well known that cold and CL316243 strongly stimulate lipolysis in adipose tissue in order to support thermogenesis (44). As expected from these results, we measured a significant increase in circulating non-esterified free fatty acids (NEFA)(Fig.S2E) and hepatic triglyceride (Fig.2N) in response to cold and CL316243. As for all the other mouse models described above, a positive correlation between liver triglycerides and *Tsk* expression was observed, suggesting that hepatic lipid deposition plays a prominent role in promoting *Tsk* transcription in response to  $\beta$ 3 adrenergic receptor stimulation (Fig.2O).

## **ER stress and inflammation promote *Tsk* transcription and release.**

Hepatic steatosis is often accompanied by ER stress and inflammation (45, 46). To define whether these biological processes participate to the control of *Tsk* expression, a series of experiments were conducted. First, to determine whether ER stress plays a role in regulating *Tsk* expression, 78 kDa glucose-regulated protein (*Grp78*) expression was measured in the liver of severely obese mice as a marker of the unfolded protein response (UPR), a signaling cascade activated by ER stress (47). *Grp78* mRNA expression was significantly increased in the liver of obese mice (Fig.S3A). In these animals, we observed a strong positive relation between *Grp78* and *Tsk* expression (Fig.S3B). Elevated GRP78 levels were also measured in the liver of MCD diet-fed mice (Fig.S3C). To directly test the impact of ER stress on *Tsk* transcription, AML12 hepatocytes were treated with escalating doses of tunicamycin, a nucleoside antibiotic that blocks N-linked glycosylation and induces severe ER stress. We found that tunicamycin acutely increased *Tsk* expression in a dose dependent manner (Fig.3A). The same effect was observed in the liver of mice acutely injected with tunicamycin (Fig.3B). Further supporting the role of the UPR in the regulation of *Tsk* expression, we found that ER-stress mediated increase in *Tsk* transcription was reduced upon inhibition of endoribonuclease/protein kinase IRE1-like protein (IRE1A) and protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase (PERK), two major effectors of the UPR (Fig.3C).

We next tested the contribution of inflammation to the regulation of hepatic *Tsk* expression. Elevated levels of pro-inflammatory cytokines were found in the liver of all the NAFLD mouse models tested (Fig.S3D to S3G). To define the direct impact of inflammation on *Tsk* transcription, AML12 cells were treated with a cocktail of pro-inflammatory cytokines. Strikingly, we found that cytokines significantly increased *Tsk* expression (Fig.3D and S3H). We next used carbon tetrachloride (CCl<sub>4</sub>) to induce an acute liver injury and hepatic inflammation in mice. A single dose of CCl<sub>4</sub> caused severe inflammation in rodents (Fig.3E). This increase was associated with elevated hepatic *Tsk* expression and high circulating TSK levels (Fig.3F and 3G). We also found that lipopolysaccharide (LPS), a component of Gram-negative bacteria with potent pro-inflammatory properties, increased circulating TSK levels in mice (Fig.S3I). These results indicate that inflammation drives *Tsk* expression. Altogether, our observations support the idea that lipid flux to the liver, ER stress and inflammation probably play complementary roles in promoting *Tsk* expression in NAFLD.

### **TSK levels are increased in response to steatosis and liver damage in humans.**

Because *Tsk* expression was increased in response to NAFLD in mice, we next asked whether this was also observed in humans. Liver samples were collected from a cohort of obese patients undergoing bariatric surgery (n=58). Triglycerides were extracted and patients were distributed into two groups based on the median liver triglyceride content (Fig.4A-B). Interestingly, we found that *TSK* expression was significantly higher in patients with elevated hepatic triglycerides (Fig.4C), thus confirming that *TSK* expression is linked to NAFLD not only in mice but also in humans. In these samples, we found a significant association between inflammatory markers and *TSK* expression, reinforcing the possible role of inflammation in promoting *TSK* expression in humans (Fig.S4A and S4B). As described above in HFD-fed mice, circulating TSK levels remained under the detection limit of our method in this human cohort (data not shown).

In order to demonstrate that TSK circulates at high levels in the presence of severe inflammation and hepatic ER stress in humans, we took advantage of samples collected from patients suffering from acetaminophen-induced acute liver failure (ALF), a condition known to cause inflammation, impair ER function and promote UPR activation (48, 49). Blood samples were collected from ALF patients rapidly after their admission to the intensive care unit and over the days following their admission (Fig.S4C). As shown in Figure 4D and 4E, plasma TSK levels were markedly elevated in many patients tested upon admission (10 out of 26). In every case, plasma TSK levels went down at later time points. Interestingly, we observed that elevated TSK levels in serum were associated with decreased transplant-free survival at hospital discharge. As shown in Figure 4F, TSK was detected in serum samples of 87.5% of the patients (7/8) that either died or received a liver transplant versus only 16.6% of the patients that survived (3/18). Consistently, TSK protein levels were significantly higher in patients that died or received a liver transplant compared to the survivors (Fig.4G). Altogether, these results indicate that TSK is a hepatokine that circulates at high levels in response to severe hepatic stress, both in mice and human, and that serum TSK might have prognostic significance in patients with ALF.

### **Modulating TSK expression does not affect NAFLD development.**

To define the functions of TSK *in vivo*, we injected mice with AAV8-TSK to overexpress TSK in the liver and elevate its circulating levels (Fig.1I, 5A, 5B and S5A). Mice overexpressing TSK did not show visible physiological differences compared to control mice (Fig.S5B). Fasting glucose and insulin levels were not different between controls and AAV8-

TSK injected mice (Fig.S5C and S5D). We next looked at the liver histology and composition to define whether TSK could directly affect NAFLD development. As shown in Figure 5C, we found no evidence of steatosis in AAV8-TSK mice. Supporting these observations, the biochemical composition of the liver (water, triglyceride, protein and glycogen) did not differ between the groups (Fig.5D). Gene expression analyses revealed that TSK did not promote inflammation, ER stress and fibrosis (Fig.5E). Altogether, these results indicate that TSK per se does not promote NAFLD development in mice.

Studies were next performed with TSK knockout mice (KO) (Fig.5F to 5H). Because TSK levels are elevated in response to obesity and steatosis, experiments with TSK KO mice were first performed in both lean and obese mice. TSK null animals were smaller compared to wild-type littermates (Fig.S5E). This phenotype was reported before and is consistent with the established role of TSK in regulating development in mice (50, 51). No differences in body weight gain were found between wild-type and TSK null mice exposed to HFD (Fig.S5F). Consistently, we found no major differences in organ weight between wild-type and KO mice (Fig.S5G). As observed in mice overexpressing TSK, fasting glucose and insulin were not different between wild-type and TSK null mice (Fig.S5H and S5I). TSK loss did not affect liver fat accumulation (Fig.5I). The biochemical composition of the liver (water, triglyceride, protein and glycogen) did not differ between the groups (Fig.5J). We observed mild signs of UPR activation in the liver of TSK null mice but no impact on inflammation and fibrosis (Fig.5K). Additional studies performed using TSK wild-type and KO mice bred to the *ob/ob* background also failed to show a major impact of TSK loss on the severity and the progression of NAFLD (Fig.S5J to L).

As described above, the rises in hepatic *Tsk* expression and circulating TSK were prominent in MCD-diet fed mice (Fig.2G and 2L). In order to define whether TSK loss could affect NAFLD severity in this model, wild-type and TSK KO mice were fed a MCD diet. Confirming previous observations, MCD diet increased circulating TSK levels in wild-type animals (Fig.S5M). As shown in Figure S5N, we found that wild-type and TSK KO mice lost the same amount of weight in response to MCD diet. No differences in organ weight were found between the genotypes (Fig.S5O). Importantly, the loss of TSK did not affect hepatic triglyceride content (Fig.S5P-Q). Moreover, we found no effect of TSK loss on the expression of genes regulating inflammation, fibrosis and ER stress (Fig.S5R), indicating that TSK loss does not affect the severity of NAFLD in animals fed a MCD diet. Studies were next performed to define whether the loss of TSK could affect liver recovery following a challenge

with MCD diet. In this experiment, wild-type and TSK null mice were fed a MCD-diet for 21 days and were next switched back a normal diet for 6 days (Fig.S5S). As shown in Figure S5T and S5U, liver triglyceride content and pro-inflammatory gene expression were not significantly affected by the loss of TSK in this model. Altogether, these results indicate that TSK loss does not affect NAFLD severity and development in various mouse models.

### **TSK impacts on systemic cholesterol homeostasis.**

We next tested the possibility that TSK secretion may impact on lipid homeostasis. Plasma triglycerides and NEFA levels were not affected by TSK overexpression (Fig.S6A). However, we measured a significant decrease in circulating cholesterol levels in these mice (Fig.6A). We found that TSK mostly impacted on HDL cholesterol levels. Of note, the opposite phenotype was observed in TSK null mice (Fig.S6B). Supporting these findings, circulating levels of ApoA1, the primary apolipoprotein found in HDL, were reduced in AAV8-TSK but increased in TSK null mice (Fig.S6C and S6D). Importantly, the impact of TSK on HDL cholesterol was reproduced in LDL receptor (LDLR) KO mice, indicating that TSK impacts on plasma cholesterol independently of this receptor (Fig.S6E and 6B). Despite lower HDL-cholesterol, we did not find changes in plasma ApoA1 concentration in response to TSK overexpression in this model, indicating that TSK reduces HDL cholesterol independently of ApoA1 modulation in LDLR KO mice (Fig.S6F).

HDLs play a central role in reverse cholesterol transport, the critical process of cholesterol movement from the extra hepatic tissues back to the liver. To test whether TSK-mediated changes in HDL levels impact on cholesterol efflux, J774 cells were loaded with radiolabelled cholesterol and efflux was measured in the presence of plasma collected from TSK overexpresser or KO mice. As shown in Figure 6C, cholesterol efflux was reduced when plasma from AAV8-TSK mice (C57BL6/J or LDLR KO) was used as the cholesterol acceptor. Conversely, a significant rise in cholesterol efflux was measured when plasma from TSK null mice was used in the assay (Fig.6D). Altogether, these observations indicate that TSK reduces circulating HDL cholesterol, an effect that functionally impacts on reverse cholesterol transport.

We next wanted to determine whether TSK affects cholesterol homeostasis by modulating key markers of cholesterol metabolism in the liver. To define how TSK acutely and chronically impacts on cholesterol metabolism, mice were sacrificed at early and late time points following AAV8-TSK injection (5 vs 28 days). AAV8-TSK injected mice showed elevated plasma TSK levels few days post-injection (Fig.S6G). We found that the reduction

in total cholesterol, HDL cholesterol and circulating ApoA1 was observed rapidly following the injection (Fig.S6H). The expression of genes coding for proteins regulating hepatic cholesterol uptake and synthesis was measured. As shown in Figure 6E (left panel), the expression of *Scavenger receptor B1 (Srb1)* and *Ldlr*, which mediate hepatic cholesterol uptake from HDL and LDL respectively, was reduced by TSK. Despite lower plasma ApoA1 in AAV8-TSK mice, hepatic mRNA expression of *Apoa1* was increased in response to TSK, presumably as an attempt to compensate and restore homeostasis. Our analyses next revealed that in addition to reduce markers of cholesterol uptake by the liver, TSK reduced the expression of *Sterol regulatory element binding transcription factor 1 (Srebf1)* and *Srebf2* and some of their target genes (Fig.6E, left panel). Altogether, these results indicate that acute TSK expression impacts on several processes to lower cholesterol flux to the liver. Interestingly, these changes were no longer observed in mice overexpressing TSK chronically for 28 days, even though these animals still showed lower liver cholesterol content, plasma HDL-cholesterol and ApoA1 levels (Fig.6E right panel and Fig.S6L).

Reverse cholesterol transport to the liver and its elimination via the biliary pathway represents an important path for cholesterol elimination. We therefore tested whether TSK-mediated reduction in HDL cholesterol and cholesterol efflux translated into changes in cholesterol conversion to bile acids (BAs) in the liver. As shown in Figure 6F, TSK reduced the expression of *Cyp7a1* and *Cyp8b1*, two rate-limiting enzymes regulating BAs synthesis in hepatocytes. This effect was more pronounced at 28 days post-injection. Consistent with these findings, targeted metabolomics analyses revealed a significant reduction in several BA species in the liver of AAV8-TSK mice chronically exposed to TSK (Fig.6G and S6J). Bile acid profiling in the blood showed a very similar pattern, thus confirming the reduction in BA synthesis (Fig.6H ad S6K). Also, AAV8-TSK mice showed a decrease in circulating levels of 7-alpha-hydroxy-4-cholesten-3-one (7aC4), a well-established marker of hepatic BAs synthesis (Fig.S6L). These findings show that the effect of TSK on circulating HDL levels and cholesterol efflux are associated with a coinciding decrease in cholesterol conversion to BAs in the liver. Collectively, our findings support a model where TSK impacts on several metabolic processes to regulate cholesterol homeostasis.

## Discussion

Here, we report the identification of TSK as a hepatokine expressed and released in response to NAFLD and liver damage in mice and humans. Gain and loss of function studies revealed that TSK impacts on cholesterol homeostasis. We report that TSK lowers circulating HDL-cholesterol, an effect linked to lower cholesterol efflux capacity and reduced cholesterol to BAs conversion in the liver. Our data identify the hepatokine TSK as a new blood biomarker of liver stress that could link NAFLD to the development of atherogenic dyslipidemia and atherosclerosis.

Inflammation and ER stress play crucial roles in promoting *Tsk* expression and release by the liver. Our observations indicate that these metabolic stresses, often present in the liver of obese patients (45, 46), could act in concert to trigger the transcription and the release of TSK. Here, we found that pro-inflammatory cytokines ( $\text{TNF}\alpha$ ,  $\text{IL1}\beta$  and  $\text{IFN}\gamma$ ) act additively to promote *Tsk* transcription in hepatocytes. We also observed that ER stress drives *Tsk* transcription downstream of IRE1A and PERK, two major effectors of the UPR. The precise identity of the transcription factors that activate *Tsk* transcription remains to be determined. It is relevant to point out that the relation between hepatic *Tsk* transcription and TSK protein release in the blood is not linear. For instance, the rise in circulating TSK levels brought by various hepatic stresses was often very robust, even in the face of modest increases in *Tsk* mRNA expression. This indicates that the elevation in circulating TSK likely involves other points of control, beyond the rise in *Tsk* transcription. It is possible that hepatic stress could activate *Tsk* translation, promote its secretion efficiency and/or increase its half-life in circulation. Additionally, we cannot exclude the possibility that TSK could, as other members of the SLRP family, accumulate in the extracellular matrix and be released in response to stress (34, 52). This mode of action could ensure a fast liberation of TSK to maximize its effects in response to liver injuries. Additional studies are needed to address all these potential mechanisms underlying TSK release in NAFLD.

NAFLD is associated with insulin resistance and atherosclerosis and predicts cardiovascular events in humans (53-58). Atherogenic alterations in lipoprotein subclasses are found in NAFLD, including increased small and dense LDL particles, low HDL-cholesterol, low ApoA1 and elevated triglycerides (59-62). Alterations in circulating HDL subfractions are also measured in patients with NAFLD (60). In line with these findings, reduced cholesterol efflux capacity was measured in plasma from humans with NAFLD (59, 63). Such reduction in cholesterol efflux was proposed as a possible mechanism linking

NAFLD to cardiovascular diseases (59, 63). How exactly NAFLD affects HDLs to reduce reverse cholesterol transport and promote cardiovascular risk is still elusive. Here, we provide evidence that the hepatokine TSK, which is actively secreted in response to NAFLD, controls HDL-cholesterol levels, cholesterol efflux and BAs synthesis in mice. Our observations are in line with other reports showing that inflammation, a condition that increases TSK, also impairs reverse cholesterol transport and BA production in both mice and humans (64). Collectively, our findings suggest that TSK might be part of a biological response aimed at limiting reverse cholesterol transport to the liver when hepatocytes are exposed to stressful conditions. Although the initial rise in TSK may exert beneficial effects for stressed hepatocytes by reducing cholesterol flux to the liver, its sustained elevation in obesity and NAFLD could potentially contribute to atherosclerosis by chronically limiting reverse cholesterol transport.

How TSK controls cholesterol homeostasis is an important question. Here, we show that hepatic TSK acutely modulates gene expression in the liver, indicating that TSK acts at least via an autocrine and/or paracrine mechanism. This supports previous literature showing that TSK is an extracellular protein that can locally affect the activity of several signaling pathways (51). Studies in chick and xenopus showed that TSK controls BMP, Wnt, FGF and TGF $\beta$  signaling during development and organogenesis by interacting with various soluble factors and receptors (51). The impact of TSK on these signaling cascades in adult tissues has never been investigated. We did not observe effects of TSK on the expression or phosphorylation levels of effectors of these signaling cascades (data not shown). Nevertheless, owing to the pleiotropic nature of TSK, other signaling nodes could likely be targeted by this hepatokine. Also, we cannot exclude the possibility that TSK could directly bind to a still unidentified membrane receptor or even interact with proteins in the plasma to modulate their functions.

Our data are consistent with the very recent identification of TSK as a new hepatokine (43, 65). However, our findings differ from that of Xiong et al. who showed that TSK deletion protects mice against NASH pathologies (65). In this report, the authors found that TSK null mice exhibit lower liver triglycerides, inflammation and fibrosis versus wild-type littermates (65). Here, neither the loss nor the overexpression of TSK had any effect on NAFLD development and progression. Several factors could have contributed to such phenotypical discordance. The most important difference between our respective reports is related to the use of different protocols to induce NAFLD. Xiong et al. used a special diet

containing fructose, fat and cholesterol for 6 months (65), a regimen known to promote high degree of liver damage in mice. In contrast, we have tested the impact of TSK loss in HFD-fed mice, *ob/ob* mice and MCD diet-fed mice. Although all these conditions promote NAFLD, the intensity of steatosis, inflammation and fibrosis was probably lower in these models (66). It is possible that the beneficial effect linked to TSK loss could be apparent only in conditions of extreme liver defects. Another possible factor that could have contributed to the different outcomes of our respective reports relates to the obesity susceptibility between the TSK mouse lines used. Here, we found no effect of TSK loss on diet-induced obesity, whereas Xiong et al. showed that TSK deletion prevents obesity (43, 65). Owing to the central role of obesity in promoting NAFLD (9, 10), the improvement in liver pathology observed by Xiong et al. could likely be an indirect consequence of reduced body weight in these mice (43, 65). The exact reason why our respective TSK null mouse models showed a different sensitivity to weight gain is unknown. Differences in the genetic background may have contributed to these differences. Indeed, the TSK KO models used by our respective teams were generated by two independent groups that used embryonic stem cells originating from different mouse strains (67, 68). Although both KO mice were backcrossed to C57BL/6J for several generations, differences in the genetic background likely persisted between the models, which could have been sufficient to alter the response to TSK loss. The contribution of genetic background to obesity susceptibility and obesity-related metabolic disturbances is well established (69-71). Alternatively, it is possible that variations in housing conditions and gut microbiota may also have affected the biological outcomes of each report (72). Additional studies are needed to resolve these issues.

Here, we provide evidence that TSK is a hepatokine whose expression and circulating levels are induced in response to NAFLD and liver damage not only in mice but also in humans. In a first human cohort, we found that TSK expression was significantly higher in patients with elevated hepatic triglycerides content. Unfortunately, circulating TSK remained under the detection limit in these samples. To demonstrate that TSK can be detected in human plasma in response to severe hepatic stress, we took advantage of samples collected from patients suffering from acetaminophen-induced ALF. In this cohort, we found that TSK levels were significantly lower in ALF patients who survived without liver transplant than those that either died or required emergency transplantation. These results suggest that TSK may potentially be used as a biomarker to discriminate between patients with adequate remaining liver parenchyma that may recover ALF from those that may not.

Our findings thus indicate that plasma TSK may have prognostic significance in these patients. Additional studies with a larger population are needed to confirm this possibility.

In conclusion, we report the identification of TSK as a hepatokine produced by the liver in response to NAFLD. We provide evidence that TSK affects cholesterol homeostasis by modulating circulating HDL-cholesterol, reverse cholesterol transport and BA synthesis in the liver. Collectively, our observations indicate that TSK could represent a new biomarker of liver stress linking NAFLD to atherogenic dyslipidemia and atherosclerosis. Additional studies are needed to define the role of TSK in regulating cholesterol metabolism and atherosclerosis development in humans.

## Material and methods

**Animal care.** All mice were on a C57BL/6J background and were purchased from the Jackson laboratory (stock number 000664). Obese mice (*ob/ob*; stock number 000632 and *db/db*; stock number 000697) and LDLR KO mice (stock number 002207) were purchased from the Jackson Laboratory. Male mice were used in all the studies. Mice were maintained on a 12:12-h light-dark cycle (lights on 0600-1800), while individually housed in ventilated cages at an ambient temperature of  $23\pm 1^{\circ}\text{C}$ . Unless stated, all mice were fed ad libitum chow. The low-fat diet (LFD) (10% kCal from fat, D12450B) and high-fat diet (HFD) (60% kCal from fat, D12492) were purchased from Research Diets. The control diet (A02082003B) and methionine-choline deficient (MCD) (A02082002B) diet were also purchased from Research Diets.

**Generation of *Tsk* knockout mice.** *Tsk* knockout mice were obtained from Genentech/Lexicon and were generated by homologous recombination, as described (68). The *Tsk* wild-type allele was amplified using the following primers: forward 5'-GACATCAATCTGAGCCATAAC-3', reverse 5'-ATGAAGGCATCTGGGTTGATG-3'. The integration of the Neo Cassette in the mutant *Tsk* allele was measured using the following primers: forward 5'-GTAGACTCTCCACAGGCATTGG-3', reverse 5'-GCAGCGCATCGCCTTCTATC-3'. Mice were backcrossed for 6 generations onto C57BL/6/J before being used experimentally. All the experiments were performed using age-matched littermates produced from breeding *Tsk* heterozygote mice.

**Overexpression of TSK in mice.** The AAV plasmid used to overexpress TSK contains an expression cassette consisting of the CMV enhancer and CBA promoter, WPRE, and SV40 polyA flanked by AAV8 inverted terminal repeats. The *Tsk* gene was inserted into the multiple cloning sites between the CBA promoter and WPRE sequence. AAV vectors were packaged by the Canadian Neurophotonics Platform (Centre de recherche CERVO, Québec, Canada). Briefly, viral particles are generated from a triple transfection of HEK 293T17 cells and collected from the culture media 5 days post-transfection. They are concentrated using a TFF setup (Vivaflow 50R 100K MWCO, Sartorius) and then purified by iodixanol gradient and ultracentrifugation. Purified particles are collected in suspension buffer (PBS 320 mM NaCl, 5% D-Sorbitol and 0.001% Pluronic F-68) and titrated by qPCR

(TaqMan) using ITR-based probe and primers. Physical titer and purity are confirmed by separating same volumes of AAV on a 10% SDS-PAGE (stain free—BioRad) in Tris-Glycine-SDS buffer. Male C57BL6/J mice (10 weeks) or LDLR KO mice were injected with 100 $\mu$ L of AAV8-GFP or AAV8-TSK via the tail vein ( $1 \times 10^{11}$  RFU/mouse). The animals were sacrificed at the indicated time following the injection.

**Human liver samples.** Liver samples were collected from non-smokers, obese men undergoing bariatric surgery (biliopancreatic diversion with duodenal switch). All participants provided written, informed consent. Triglycerides were extracted from the samples and the patients were distributed into two groups based on their median triglyceride content. RNA was extracted from the same samples and TSK expression was measured by qPCR.

**Serum samples from ALF patients.** Samples were collected along with corresponding clinical information from patients with ALF. Inclusion criteria were: For the purposes of this study, acute liver failure (ALF) was defined as an internationalized ratio (INR)  $\geq 1.5$  and hepatic encephalopathy (HE) within the first 26 weeks of liver disease in a patient with an acute hepatic insult (73). The etiology of ALF for all patients in this analysis was acetaminophen toxicity (APAP-ALF). HE grade was defined by the West Haven Criteria (simplified) as follows; grade 1 ~ any alteration in mentation, grade 2 being somnolent or obtunded but easily rousable or presence of asterixis, grade 3 being rousable with difficulty and, grade 4: unresponsive to deep pain (74) and age  $\geq 18$  years. Exclusion criteria were: (1) cirrhosis/acute-on chronic liver failure. Serum samples were collected from 26 patients upon admission to the intensive care unit (early; day 1) and post-admission (between day 3 to 9) when available. Clinical, biochemical and outcome data were collected prospectively and were analyzed for the 26 patients included in this study. Data assessed included demographic (age, race, sex), comorbidities, biochemistry at the time of sample collection (complete blood count, creatinine, transaminases, phosphate, international normalized ratio (INR), bilirubin, lactate), hepatic coma grade and requirement for organ support (mechanical ventilation (MV), vasopressors, and renal replacement therapy (RRT)). TSK levels were measured in plasma samples by western blotting. Recombinant TSK (R&D System, 3940-TS-050) was used as an internal standard to quantify plasma TSK levels.

**Cell culture.** AML12 cells (ATCC (CRL-2254)) were cultured in a 1:1 mixture of Dulbecco's modified Eagle's medium and Ham's F12 medium with 0.005 mg/ml insulin, 0.005 mg/ml transferrin, 5 ng/ml selenium, and 40 ng/ml dexamethasone, 90% fetal bovine serum, 10%. To measure the secretion of TSK, 293T (ATCC (CRL-3216)) cells overexpressing TSK were plated one day before the experiment. The following day, cells were washed with PBS and the medium was replaced with fresh DMEM containing 10% FBS (1ml/well). Supernatant and protein lysates were collected at times 0h, 6h, 12h, 24h and 48h for Western blot analyses. Supernatant was centrifuged for 5 minutes to remove cell debris.

**Virus preparation and cell infection.** Mouse TSK and  $\Delta$ -TSK were cloned into MSCV (gift from Lin He, Addgene plasmid # 24828). Viruses were produced using gag/pol and CMV VSV-G as the packaging system. Cells were infected for 24 hours in the presence of 8  $\mu$ g/ml polybrene. After infection, the cells were dispersed into fresh medium. Cells were selected on the following days with 1  $\mu$ g/ml puromycin.

**Quantitative real-time PCR.** Total mRNA was isolated from tissues using the RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (Qiagen, 74104). Total mRNA was isolated from cells using E.Z.N.A. Total RNA Kit I (Omega Biotek, R6834-02). The RNA concentrations were estimated from absorbance at 260 nm. cDNA synthesis was performed using the iScript™ Advanced cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR (Bio-Rad) as described (75). mRNA extraction and cDNA synthesis were performed following the manufacturer's instructions. cDNA was diluted in DNase-free water (1:15) before quantification by real-time PCR. mRNA transcript levels were measured in duplicate samples using CFX96 or CFX384 touch™ real-time PCR (Bio-Rad, Mississauga, ON, Canada). Chemical detection of the PCR products was achieved with SYBR Green (Bio-Rad, 172-5271) as previously described (75). Gene expression was corrected for the expression level of reference gene.

**Triglyceride extraction and measurement.** Lipids were extracted from tissues as described by Folch (76). The extracted triglycerides were suspended in isopropanol and quantified using a commercial assay kit (Thermo Fisher Scientific, TR22421).

**Cholesterol efflux.** Cholesterol efflux assay was performed as previously described (77). Briefly, J774A.1 macrophages (ATCC TIB-67) were grown to 70-75% confluence in 48-well plates. Cells were then loaded with 3H-cholesterol for 18h (0.5  $\mu$ Ci per well; PerkinElmer, Waltham, MA, USA) in DMEM containing 1% FBS. On the next day, cells were washed with warm PBS and exposed to polyethylene glycol-treated mouse serum (2% v/v final) for 4 h. Percentage of cholesterol efflux was then calculated, ratio of supernatant/(supernatant+lysate).

**Glycogen extraction and measurement.** Glycogen was measured in liver samples as described (78).

**Plasma metabolite measurement.** Blood was collected using syringes conditioned with EDTA. Plasma was stored at -80°C for further biochemical analyses. Plasma metabolites were measured using the following commercial kits; insulin (EMD Millipore, SRI-13K,), triglycerides (Thermo Fisher Scientific, TR22421), NEFAs (Wako, 999-34691, 995-34791, 991-34891, 993-35191, 276-76491). Cholesterol was measured using a commercial assay kit (Randox laboratories, CH200) according to the manufacturer's instructions. Plasmas were depleted from LDLs and VLDLs using a PEG solution. Briefly, plasma was incubated with a 20% PEG6000 solution (20% (p/v) in 200mM glycine / H<sub>2</sub>O, pH 7.4) at a 5/2 ratio on ice for 20min. The mix was centrifuged 30min at 10 000rpm at 4°C. The supernatant was used to measure HDL-c with the same commercial assay kit used for total cholesterol. Circulating glucose levels were measured from tail blood using an instant glucometer (Roche, Accu-Chek Performa). Mouse ApoA1 was measured using an ELISA kit (Abcam, ab238260)

**Western blotting.** All cells were rinsed twice with ice-cold PBS before lysis. Cells were lysed with Triton-X 100 containing lysis buffer (50 mM HEPES, pH 7.4, 2 mM EDTA, 10 mM sodium pyrophosphate, 10 mM sodium glycerophosphate, 40 mM NaCl, 50 mM NaF, 2 mM sodium orthovanadate, 1% Triton-X 100, and one tablet of EDTA-free protease inhibitors per 25 ml). Tissues were homogenized with the same buffer supplemented with 0.1% sodium lauryl sulfate and 1% sodium deoxycholate. Cells and tissues were rotated at 4°C for 10 minutes and then the soluble fractions of cell lysates were isolated by centrifugation

for 10 min in a microcentrifuge. Protein levels were then quantified using Bradford reagents and analyzed by Western blotting. Samples were loaded on 10% Tris-Glycine precast gels (Life Technologies). Proteins were transferred to PVDF membranes blocked in 5% milk diluted in PBS-Tween and incubated with their primary antibody overnight at 4°C. The following antibodies were used: GRP78 (C50B12, Cell Signaling Technology, dilution 1:1000), AKT(pan) (C67E7, Cell Signaling Technology, dilution 1:1000),  $\beta$ -Actin (4967, Cell Signaling Technology, dilution 1:1000), phospho-PKA substrate (RRXS\*/T\*)(100G7E) (9624S), Tyrosine hydroxylase antibody (NB300-109, Novus, dilution 1:1000), TSK (Immune Bio Solutions). Secondary antibodies were purchased from Cell Signaling Technology (7076S and 7074S) and Immune Bio Solutions (Y00008-HRP) and diluted 1:5000. Amersham ECL Western Blotting Detection Reagent (RPN2106) was used to image the blots.

**Antibody generation.** Antibodies were raised against TSK in egg-laying White Leghorn hens through a collaboration with Immune Biosolutions. Animals were injected at day 0 with emulsification mixture of antigen peptide and Freund's complete adjuvant (Rockland, Limerick, PA). The immunogen sequence corresponds to the amino acids 323-335 of mouse TSK (323-EGAYHRQPGSSPK-335). Hens received two booster injections with Freund's incomplete adjuvant (Rockland, Limerick, PA) on days 21 and 42. The eggs were collected from the day 21 to 63. IgY's were harvested from egg yolks. Briefly, egg yolks were degreased and protein containing antibodies precipitated with ammonium sulfate. TSK peptides were coupled with Sulfhydryl-Reactive Resin (ProteoChem, Hurricane, UT). Specific anti-TSK antibodies were then immunopurified on an immunoaffinity column. The concentrations of immunopurified IgY's were estimated by measuring the absorbance at 280 nm (an optical density at 280 nm of 1.35 equals 1 mg of IgY/ml).

**Bile acid measurements.** Plasma, liver and fecal bile acids were assessed using liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) with an electrospray interface, as previously described (79). The chromatographic system consisted of an Alliance 2690 HPLC apparatus (Waters, Milford, MA), and the tandem mass spectrometry system was an API3200 mass spectrometer (Applied Biosystems, Concord, Canada).

**Statistics.** Values are presented as mean  $\pm$  SEM. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism. When comparing 2 groups, significance was determined by two-tailed, unpaired t test. Experiments with multiple groups were analysed using One-way ANOVA with multiple comparisons (Tukey's multiple comparison). Experiments including multiple groups and factors were analyzed using Two-way ANOVA with multiple comparisons (Sidak's multiple comparison). The Fisher exact test was used to compare the proportion of ALF patients with detectable serum TSK at admission that either died or received a liver transplant versus the patients that survived. For non-parametric variables, significance was determined using a Wilcoxon rank sum test.

**Study approval.** All experimental protocols were approved by the Animal Ethics Committee of Université Laval (CPAUL) and in accordance with the guidelines of the Canadian Council on Animal Care. Human liver samples were obtained from the Biobank of the Institut universitaire de cardiologie et de pneumologie de Québec – Université Laval in compliance with Institutional Review Board-approved management modalities. Samples from ALF patients were collected as part of a study approved by the Health Ethics Review Board (HREB) at the University of Alberta (Pro00052591).

## **Acknowledgments**

The authors are grateful to Yves Deshaies, Émile Levy, Roger McLeod and Benoît Arsenault for advices and assistance. The authors also acknowledge the invaluable collaboration of the surgery team, bariatric surgeons and biobank staff of the IUCPQ. This work was supported by grants from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) (271671 and 374552), Les Fonds de recherche du Québec – Santé (FRQS)(24726), Le Réseau de recherche en santé cardiométabolique, diabète et obésité (CMDO), Le Réseau de bio-imagerie du Québec (RBIQ), Diabète Québec, La Fondation de l'Institut universitaire de cardiologie et de pneumologie de Québec – Université Laval (IUCPQ-UL) and Merck Sharpe and Dohme Corp/Faculté de Médecine de l'Université Laval to M.L. Alexandre Caron is a CIHR Banting postdoctoral fellow.

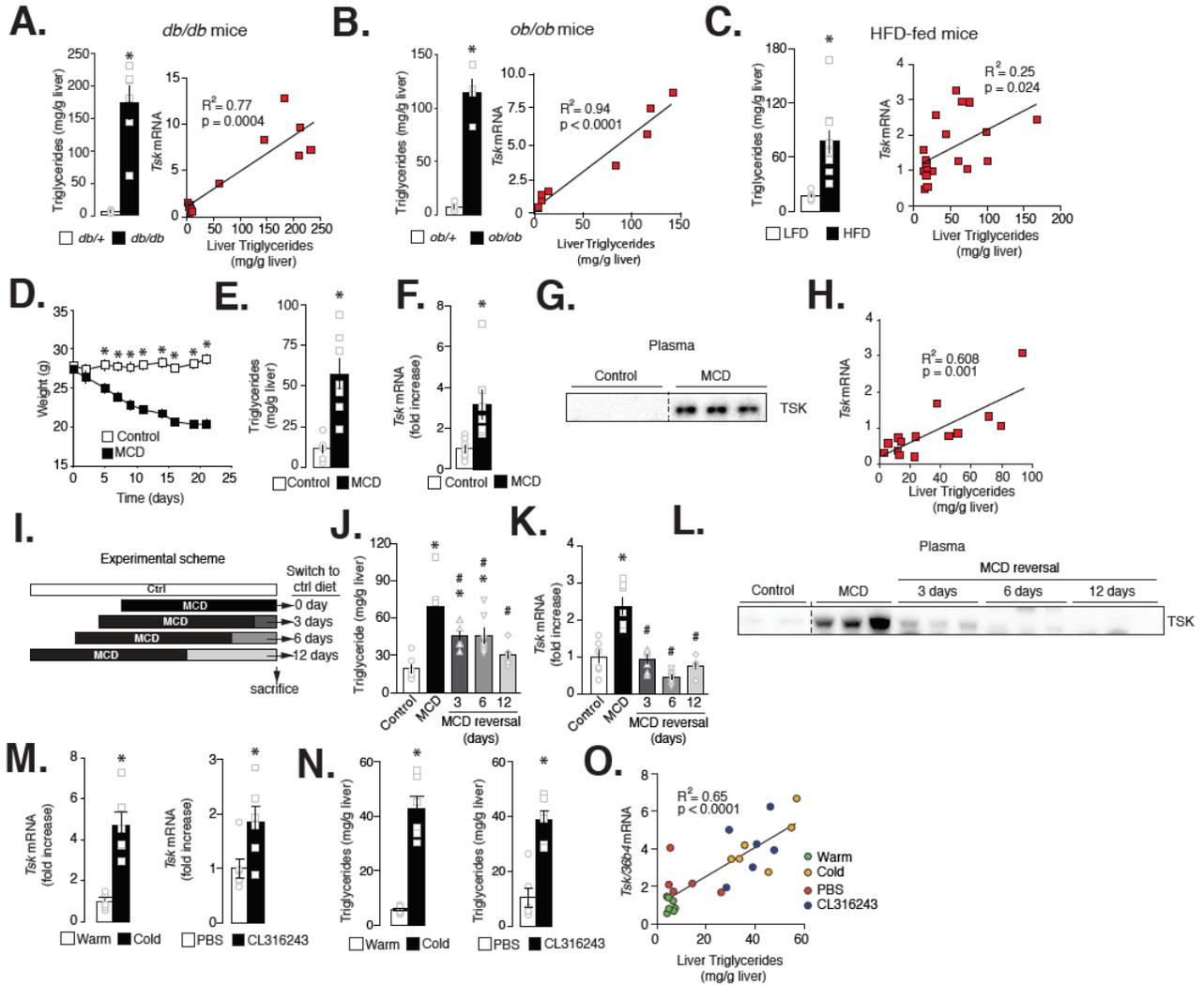
## **Author contributions**

M.L., E.C. and M.M. designed research studies; M.M., E.C., M.A., A.C., E.J. L.T., I.K., M.J.B., C.R., S.M.L., S.M.L., Y.G., J.T., P.M. and M.L., conducted experiments and acquired data; M.M., E.C., T.V.V., J.L., F.G., P.J., C.J.K., O.B., M.C.M and M.L. analyzed data; C.J.K, C.F.R. and W.T.F. provided reagents; W.F.T., O.B., M.C.M. and A.M. provided valuable scientific input during the studies; M.M. and M.L. wrote manuscript.



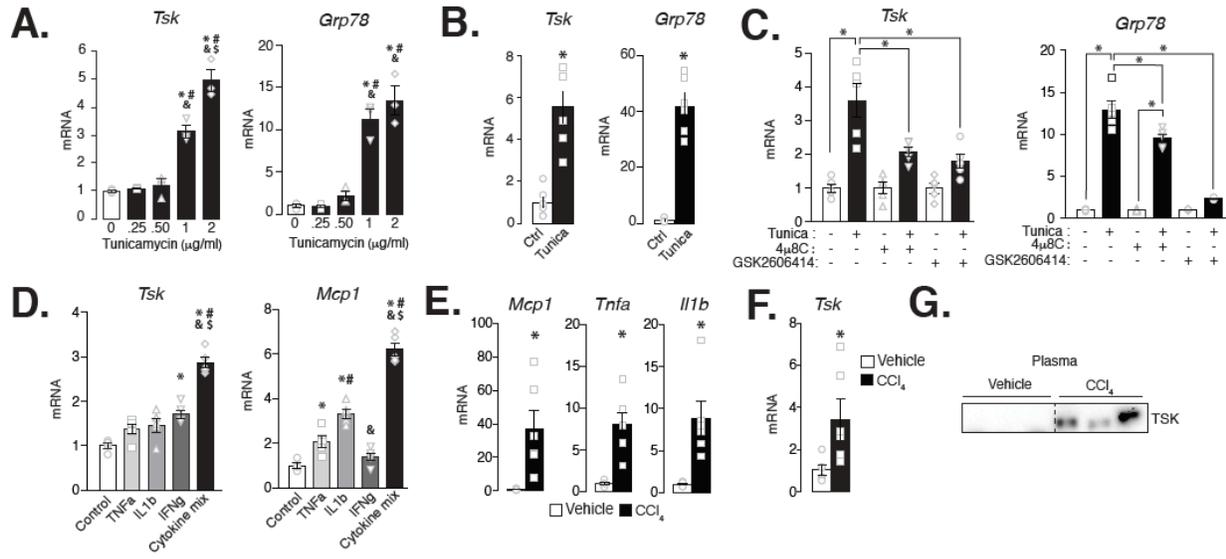
**Figure 1. TSK is a hepatokine induced by obesity.** **(A)** Summary of the experimental approach designed to identify liver-specific secreted proteins regulated in conditions of obesity. **(B)** Gene expression profile comparing the expression of *Tsk* in various mouse tissues and cell types. The microarray data used in this panel are available through NCBI's Gene Expression Omnibus (accession number GSE10246). **(C-E)** qPCR analysis of *Tsk* transcript expression in the liver of **(C)** littermates control and *db/db* mice (n=5-6/group) (10 weeks old), **(D)** littermates control and *ob/ob* mice (n=4-5/group) (12 weeks old) and **(E)** LFD and HFD-fed mice C57BL/6J (n=10/group) (11-13 weeks old fed a LFD or HFD for 10 weeks). Data represent the mean  $\pm$  SEM. Significance was determined by two-tailed, unpaired *t* test. \**P* < 0.05 versus controls. **(F)** Schematic representation of human and mouse TSK protein. **(G)** Western blot analysis of cell lysates and culture media of 293T cells overexpressing human TSK. Cells were plated the day before and culture medium was changed at time 0. Cells were lysed and culture medium was collected at the indicated time. AKT was used as a loading control. **(H)** Western blot analysis of cell lysates and culture media of 293T cells overexpressing human TSK or a mutated form lacking the signal peptide ( $\Delta$ -TSK). Samples were processed as described in G. **(I-J)** Western blot analysis of **(I)** tissues samples or **(J)** plasma collected from C57BL/6J mice injected with AAV8-GFP or AAV8-TSK. Mice were sacrificed 4 weeks following AAV8 injection. **(K-L)** Western blot analysis of plasma TSK levels in **(K)** control and *db/db* mice and **(L)** control and *ob/ob* mice. Representative samples are shown.

**Figure 2.**



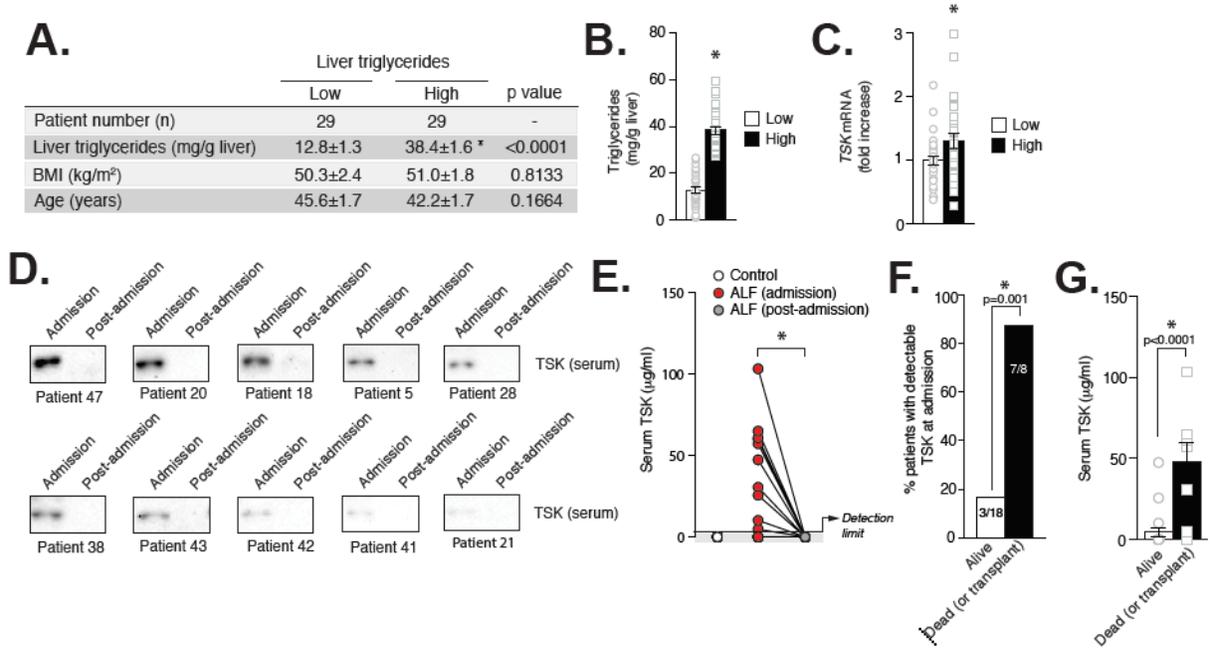
**Figure 2. *Tsk* expression correlates with liver steatosis in multiple mouse models.** (A-C) Hepatic triglyceride content in (A) control and *db/db* mice (n=5-6/group) (10 weeks old), (B) control and *ob/ob* mice (n=4-5/group) (12 weeks old) or (C) LFD and HFD-fed mice (n=10/group) (11-13 weeks old fed a LFD or HFD for 10 weeks). For each mouse model, the correlation between *Tsk* transcript levels and hepatic triglyceride content is presented. (D) Body weight of male mice fed a control or a MCD diet for 21 days (n=7/group). (E) Hepatic triglyceride content measured in mice fed a control or a MCD diet (n=7/group). (F) qPCR analysis of *Tsk* expression in the liver of control and MCD diet-fed mice (n=7/group). (G) Western blot analysis of plasma TSK levels in control and MCD diet-fed mice. Representative samples are shown. (H) Correlation calculated between *Tsk* transcript levels and hepatic triglyceride content in control and MCD diet-fed mice (n=14). (I) Experimental scheme of the MCD reversal experiments. Mice were fed a control or MCD diet for 21 days. Before being switched back to a control diet for 3, 6 or 12 days. (J) Hepatic triglyceride content and (K) *Tsk* mRNA expression levels measured in mice included in the MCD reversal study described in I (n=6-7/group). (L) Western blot analysis of plasma TSK levels in the MCD reversal study. Representative samples are shown. (M) qPCR analysis of *Tsk* expression in the liver of male mice housed at thermoneutrality (30°C) or exposed to cold (10°C) for 6 hours (n=6/group) (left part) or in mice injected with saline (vehicle) or CL316243 (0.1mg/kg) for 4 hours (n=6/group) (right panel). In these experiments, male mice (10-12 weeks old) were used. (N) Hepatic triglyceride content in the experiment described in M. (O) Correlation calculated between *Tsk* transcript levels and hepatic triglyceride content in control mice and mice exposed to cold or injected with CL316243 as described in M (n=24). In all panels, data represent the mean  $\pm$  SEM. In panels A, B, C, E, F, M and N significance was determined by two-tailed, unpaired *t* test. \**P* < 0.05 versus controls. Pearson correlations (two-tailed) were calculated in panel A to C, H and O. In panel D, Two-way ANOVA with multiple comparisons (Sidak's multiple comparison) was performed. \**P* < 0.05 versus control. In panels J and K, One-way ANOVA with multiple comparisons (Tukey's multiple comparison) were performed. \**P* < 0.05 versus control. # *P* < 0.05 versus MCD.

**Figure 3.**



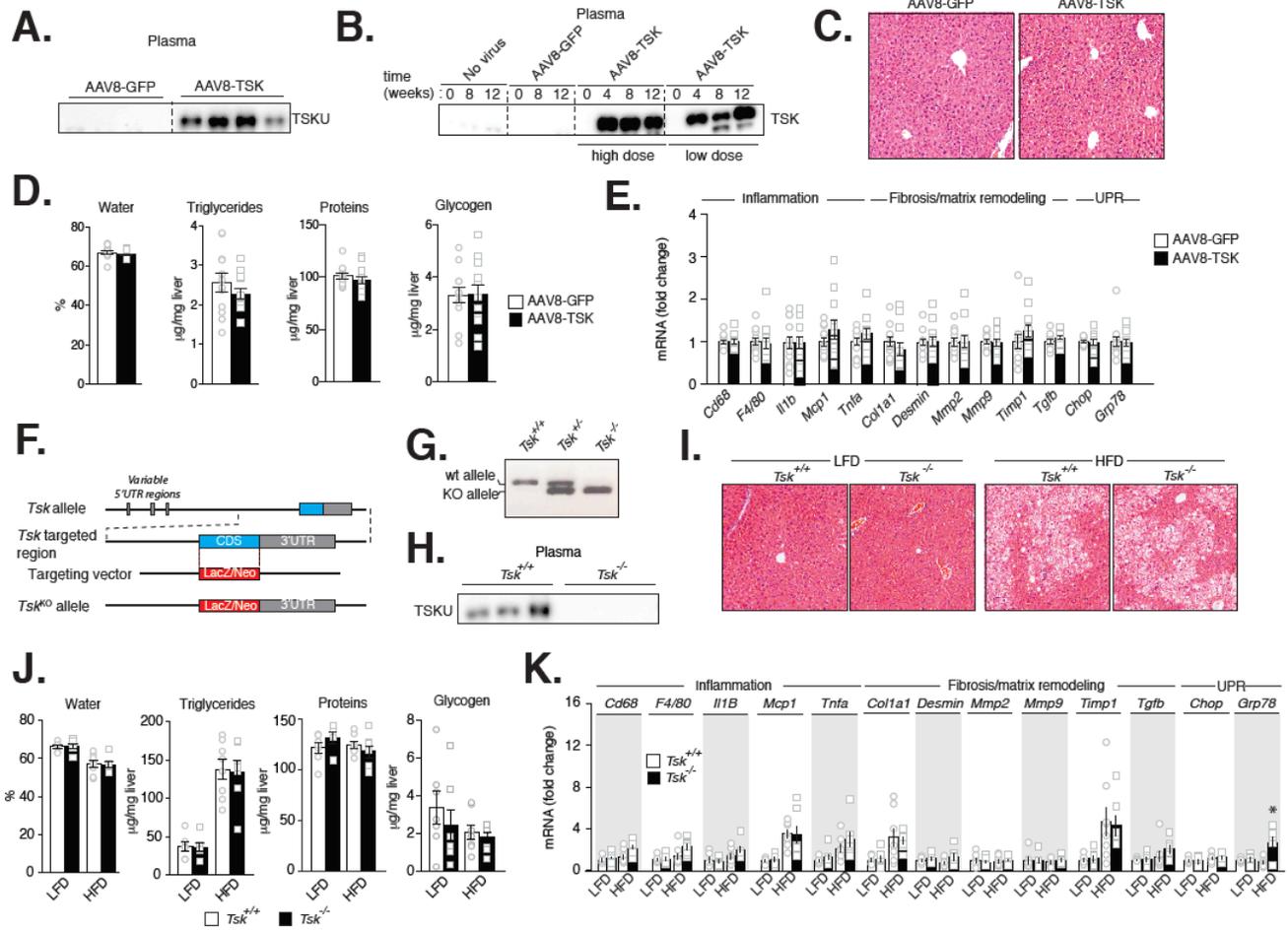
**Figure 3. ER stress and inflammatory mediators promote *Tsk* expression and release.** **(A)** qPCR analysis of *Tsk* and *Grp78* transcript levels in AML12 hepatocytes treated or not with tunicamycin for 8 hours (n=3/condition). **(B)** qPCR analysis of *Tsk* and *Grp78* transcript levels in the liver of male mice (10 weeks old) injected with tunicamycin (n=6/group). Mice were injected with tunicamycin (2mg/kg) and sacrificed 8 hours later. **(C)** qPCR analysis of *Tsk* and *Grp78* transcript levels in AML12 cells pre-treated with the indicated inhibitors (4 $\mu$ 8C, 100 $\mu$ M; GSK2606414, 1 $\mu$ M) for 1 hour and then treated or not with tunicamycin for 8 hours (n=5/condition). **(D)** qPCR analysis of *Tsk* and *Mcp1* transcript levels in AML12 cells treated with TNF $\alpha$  (5ng/ml), IL1 $\beta$  (20ng/ml), IFN $\gamma$  (5000U/ml) or a mixture of these cytokines for 8 hours (n=5/condition). **(E)** qPCR analysis of *Mcp1*, *Tnfa* and *I11b* transcripts in the liver of male mice (10-12 weeks old) injected with either vehicle or CCl4 (40%, 1ml/kg) (n=6 mice/group). Mice were sacrificed 24 hours after the injection. **(F)** qPCR analysis of *Tsk* transcript in the liver of mice injected with either vehicle or CCl4. **(G)** Western blot analysis of plasma TSK levels in mice injected with either vehicle or CCl4. Representative samples are shown. In all panels, data represent the mean  $\pm$  SEM. One-way ANOVA with multiple comparisons (Tukey's multiple comparison) were performed in panel A, C and D. In panel A, \* denotes significance ( $P < 0.05$ ) versus dose 0, # denotes significance ( $P < 0.05$ ) versus dose 0.25 $\mu$ g/ml, & denotes significance ( $P < 0.05$ ) versus dose 0.50 $\mu$ g/ml and \$ denotes significance ( $P < 0.05$ ) versus dose 1.0 $\mu$ g/ml. In panel C, \* denotes significance ( $P < 0.05$ ). In panel D, \* denotes significance ( $P < 0.05$ ) versus control, # denotes significance ( $P < 0.05$ ) versus TNF $\alpha$ , & denotes significance ( $P < 0.05$ ) versus IL1 $\beta$  and \$ denotes significance ( $P < 0.05$ ) versus IFN $\gamma$ . In panels B, E and F, significance was determined by two-tailed, unpaired *t* test. \* $P < 0.05$  versus controls.

**Figure 4.**



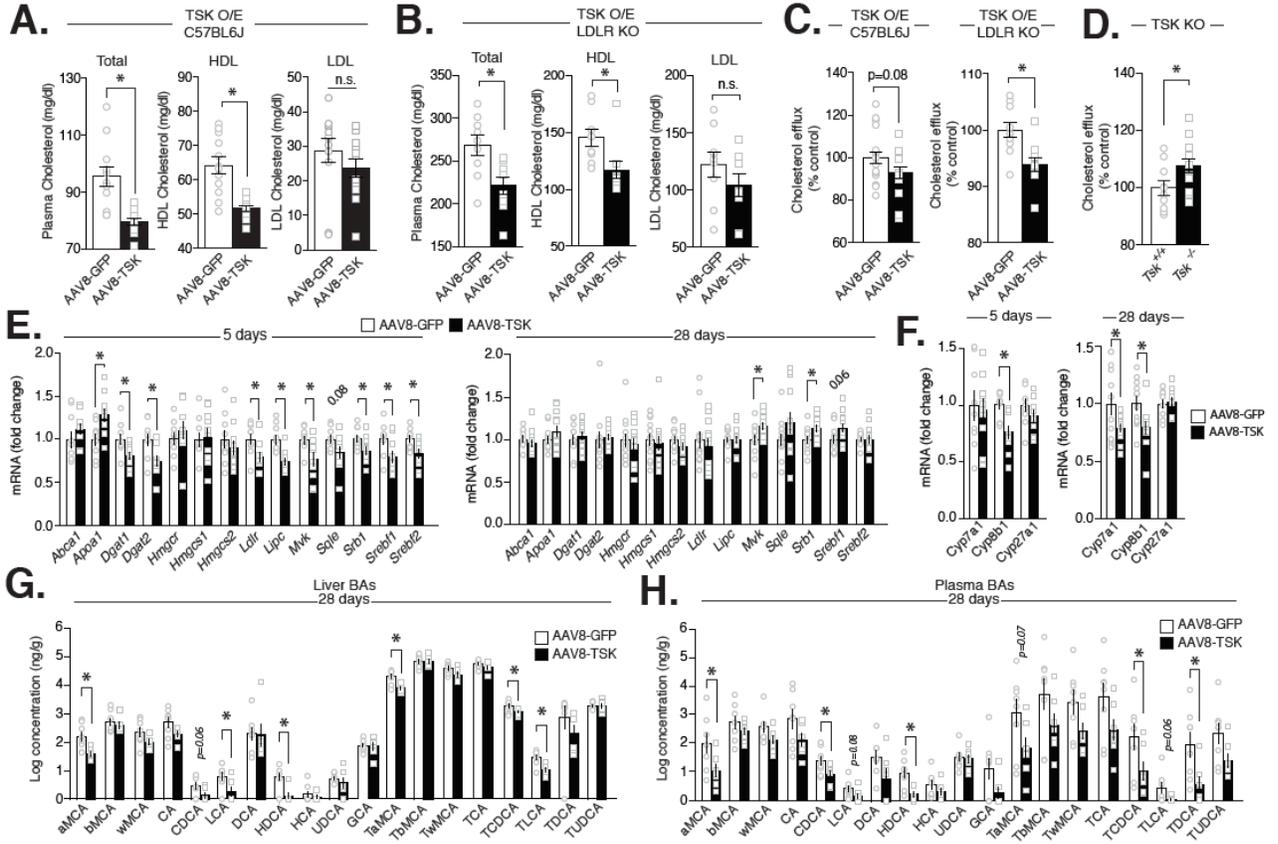
**Figure 4. TSK levels are increased in response to steatosis and liver damages in humans.** (A) Characteristics of the human patients included in our study. Liver samples were collected from 58 patients and triglycerides were extracted and measured. Triglycerides were extracted and patients were distributed into two groups based on the median triglycerides content of the samples. (B) Triglyceride content of the liver samples described in A (n=29/group). (C) TSK mRNA expression levels measured in humans with Low or High hepatic triglycerides (n=29/group). (D) Western blot analysis and (E) quantification of TSK in serum of humans suffering from acetaminophen-induced ALF. Blood samples were collected from patients upon their admission to the intensive care unit. Other blood samples were collected post admission (between 3 and 9 days) (n=26). The samples presented in D are the ones in which TSK was detected and quantified. (F) Proportion of ALF patients with detectable serum TSK at admission that either died or received a liver transplant versus the patients that survived. (G) Comparison of TSK levels at admission between patients that either died or received a liver transplant versus the patients that survived. In all panels, data are presented as the mean  $\pm$  SEM. In panel A and B, significance was determined by two-tailed, unpaired *t* test. \**P* < 0.05 versus controls. In panel E, significance was determined by two-tailed, paired *t* test. \**P* < 0.05 comparing TSK at admission vs. post-admission. In panel F, significance was determined using Fisher exact test. \**P* < 0.05 vs survivors. In panel G, significance was determined by two-tailed, unpaired *t* test. \**P* < 0.05 vs survivors.

**Figure 5.**



**Figure 5. TSK does not affect NAFLD development.** (A) Male mice (10 weeks old) were injected with AAV8-GFP or AAV8-TSK. Western blot analysis of plasma samples were analysed 4 weeks following AAV8 injection. Representative samples are shown. (B) Western blot showing that mice injected with AAV8-TSK show a stable rise in circulating TSK protein levels. (C) Hematoxylin and eosin stained sections of liver samples collected from AAV8-GFP and AAV8-TSK mice. Representative pictures are shown. (D) Water, triglyceride, protein and glycogen content of liver samples collected from AAV8-GFP and AAV8-TSK mice (n=12/group). (E) qPCR analysis of various genes in the liver of AAV8-GFP and AAV8-TSK mice (n=11-12/group). (F) Schematic overview of the strategy used to produce TSK knockout mice. (G) Genotyping validation showing the wt and ko alleles in  $Tsk^{+/+}$ ,  $Tsk^{+/-}$  and  $Tsk^{-/-}$  mice. (H) Western blot analysis of plasma samples collected from wild-type ( $Tsk^{+/+}$ ) and knockout ( $Tsk^{-/-}$ ) mice injected with CCl<sub>4</sub>. Blood was collected 24 hours after the injection of CCl<sub>4</sub>. (I) Hematoxylin and eosin stained sections of liver samples collected from male wild-type ( $Tsk^{+/+}$ ) and knockout ( $Tsk^{-/-}$ ) mice fed either LFD or HFD for 19 weeks. Representative pictures are shown. (J) Water, triglyceride, protein and glycogen content of liver samples collected from wild-type ( $Tsk^{+/+}$ ) and knockout ( $Tsk^{-/-}$ ) mice fed either LFD or HFD (n=6-8/group). (K) qPCR analysis of various genes in the liver of wild-type ( $Tsk^{+/+}$ ) and knockout ( $Tsk^{-/-}$ ) mice fed either LFD or HFD diet for 19 weeks (n=6-8/group). In all panels, data are presented as the mean  $\pm$  SEM. In panels D and E significance was determined by two-tailed, unpaired *t* test. In panels J and K, two-way ANOVA with multiple comparisons were performed between wild-type ( $Tsk^{+/+}$ ) and knockout ( $Tsk^{-/-}$ ) mice for each diet. \**P* < 0.05 versus wild-type ( $Tsk^{+/+}$ ) mice. Absence of asterisk denotes no significant changes between the groups.

**Figure 6.**



**Figure 6. TSK impacts systemic cholesterol homeostasis. (A-B)** Plasma cholesterol levels measured in samples collected from male **(A)** C57BL/6J mice (n=12/group) or **(B)** LDLR KO mice (n=9/group) injected with AAV8-GFP or AAV8-TSK. Blood samples were analysed from mice 4 weeks following AAV8 injection. **(C-D)** Cholesterol efflux capacity measured using plasma collected from **(C)** C57BL/6J mice (n=16-19/group) and LDLR KO mice (n=10/group) injected with AAV8-GFP or AAV8-TSK or **(D)** wild-type (*Tsk*<sup>+/+</sup>) and knockout (*Tsk*<sup>-/-</sup>) mice (n=10-13/group). **(E-F)** qPCR analyses of in the liver of male mice sacrificed after either 5 days (left) or 28 days (right) (n=12/group) following injection with AAV8-GFP or AAV8-TSK. **(G-H)** Bile acid profiling in **(G)** the liver and **(H)** the plasma of mice sacrificed 28 days (n=6-8/group) following injection with AAV8-GFP or AAV8-TSK. Values are log transformed. In all panels, data are presented as the mean ± SEM. Significance was determined by two-tailed, unpaired *t* test. \**P* < 0.05 versus control.

## Bibliography

1. Flegal KM, Kruszon-Moran D, Carroll MD, Fryar CD, and Ogden CL. Trends in Obesity Among Adults in the United States, 2005 to 2014. *JAMA*. 2016;315(21):2284-91.
2. Ogden CL, Carroll MD, Lawman HG, Fryar CD, Kruszon-Moran D, Kit BK, and Flegal KM. Trends in Obesity Prevalence Among Children and Adolescents in the United States, 1988-1994 Through 2013-2014. *JAMA*. 2016;315(21):2292-9.
3. Ng M, Fleming T, Robinson M, Thomson B, Graetz N, Margono C, Mullany EC, Biryukov S, Abbafati C, Abera SF, et al. Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet*. 2014;384(9945):766-81.
4. Després JP, and Lemieux I. Abdominal obesity and metabolic syndrome. *Nature*. 2006;444(7121):881-7.
5. Tchernof A, and Despres JP. Pathophysiology of human visceral obesity: an update. *Physiol Rev*. 2013;93(1):359-404.
6. Birkenfeld AL, and Shulman GI. Nonalcoholic fatty liver disease, hepatic insulin resistance, and type 2 diabetes. *Hepatology (Baltimore, Md)*. 2014;59(2):713-23.
7. Utzschneider KM, and Kahn SE. Review: The role of insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006;91(12):4753-61.
8. Meex RCR, and Watt MJ. Hepatokines: linking nonalcoholic fatty liver disease and insulin resistance. *Nature reviews Endocrinology*. 2017;13(9):509-20.
9. Younossi Z, Anstee QM, Marietti M, Hardy T, Henry L, Eslam M, George J, and Bugianesi E. Global burden of NAFLD and NASH: trends, predictions, risk factors and prevention. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2018;15(1):11-20.
10. Younossi ZM, Koenig AB, Abdelatif D, Fazel Y, Henry L, and Wymer M. Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease-Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology (Baltimore, Md)*. 2016;64(1):73-84.
11. Leite NC, Salles GF, Araujo AL, Villela-Nogueira CA, and Cardoso CR. Prevalence and associated factors of non-alcoholic fatty liver disease in patients with type-2 diabetes mellitus. *Liver Int*. 2009;29(1):113-9.
12. Ludwig J, Viggiano TR, McGill DB, and Oh BJ. Nonalcoholic steatohepatitis: Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease. *Mayo Clin Proc*. 1980;55(7):434-8.
13. Wicklow BA, Wittmeier KD, MacIntosh AC, Sellers EA, Ryner L, Serrai H, Dean HJ, and McGavock JM. Metabolic consequences of hepatic steatosis in overweight and obese adolescents. *Diabetes Care*. 2012;35(4):905-10.
14. Oni ET, Agatston AS, Blaha MJ, Fialkow J, Cury R, Sposito A, Erbel R, Blankstein R, Feldman T, Al-Mallah MH, et al. A systematic review: burden and severity of subclinical cardiovascular disease among those with nonalcoholic fatty liver; should we care? *Atherosclerosis*. 2013;230(2):258-67.
15. Bonora E, and Targher G. Increased risk of cardiovascular disease and chronic kidney disease in NAFLD. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2012;9(7):372-81.
16. Stefan N, and Haring HU. The role of hepatokines in metabolism. *Nature reviews Endocrinology*. 2013;9(3):144-52.
17. Stefan N, Hennige AM, Staiger H, Machann J, Schick F, Krober SM, Machicao F, Fritsche A, and Haring HU. Alpha2-Heremans-Schmid glycoprotein/fetuin-A is associated with insulin resistance and fat accumulation in the liver in humans. *Diabetes Care*. 2006;29(4):853-7.

18. Meex RC, Hoy AJ, Morris A, Brown RD, Lo JC, Burke M, Goode RJ, Kingwell BA, Kraakman MJ, Febbraio MA, et al. Fetuin B Is a Secreted Hepatocyte Factor Linking Steatosis to Impaired Glucose Metabolism. *Cell Metab.* 2015;22(6):1078-89.
19. Badman MK, Pissios P, Kennedy AR, Koukos G, Flier JS, and Maratos-Flier E. Hepatic fibroblast growth factor 21 is regulated by PPARalpha and is a key mediator of hepatic lipid metabolism in ketotic states. *Cell Metab.* 2007;5(6):426-37.
20. Wu HT, Lu FH, Ou HY, Su YC, Hung HC, Wu JS, Yang YC, Wu CL, and Chang CJ. The role of hepassocin in the development of non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol.* 2013;59(5):1065-72.
21. Hansen J, Brandt C, Nielsen AR, Hojman P, Whitham M, Febbraio MA, Pedersen BK, and Plomgaard P. Exercise induces a marked increase in plasma follistatin: evidence that follistatin is a contraction-induced hepatokine. *Endocrinology.* 2011;152(1):164-71.
22. Hansen JS, Rutti S, Arous C, Clemmesen JO, Secher NH, Drescher A, Gonelle-Gispert C, Halban PA, Pedersen BK, Weigert C, et al. Circulating Follistatin Is Liver-Derived and Regulated by the Glucagon-to-Insulin Ratio. *J Clin Endocrinol Metab.* 2016;101(2):550-60.
23. Tao R, Wang C, Stohr O, Qiu W, Hu Y, Miao J, Dong XC, Leng S, Stefater M, Stylopoulos N, et al. Inactivating hepatic follistatin alleviates hyperglycemia. *Nat Med.* 2018;24(7):1058-69.
24. Hashimoto O, Funaba M, Sekiyama K, Doi S, Shindo D, Satoh R, Itoi H, Oiwa H, Morita M, Suzuki C, et al. Activin E Controls Energy Homeostasis in Both Brown and White Adipose Tissues as a Hepatokine. *Cell reports.* 2018;25(5):1193-203.
25. Sugiyama M, Kikuchi A, Misu H, Igawa H, Ashihara M, Kushima Y, Honda K, Suzuki Y, Kawabe Y, Kaneko S, et al. Inhibin betaE (INHBE) is a possible insulin resistance-associated hepatokine identified by comprehensive gene expression analysis in human liver biopsy samples. *PLoS ONE.* 2018;13(3):e0194798.
26. Lan F, Misu H, Chikamoto K, Takayama H, Kikuchi A, Mohri K, Takata N, Hayashi H, Matsuzawa-Nagata N, Takeshita Y, et al. LECT2 functions as a hepatokine that links obesity to skeletal muscle insulin resistance. *Diabetes.* 2014;63(5):1649-64.
27. Yang Q, Graham TE, Mody N, Preitner F, Peroni OD, Zabolotny JM, Kotani K, Quadro L, and Kahn BB. Serum retinol binding protein 4 contributes to insulin resistance in obesity and type 2 diabetes. *Nature.* 2005;436(7049):356-62.
28. Ma X, Zhou Z, Chen Y, Wu Y, and Liu Y. RBP4 functions as a hepatokine in the regulation of glucose metabolism by the circadian clock in mice. *Diabetologia.* 2016;59(2):354-62.
29. Misu H, Takamura T, Takayama H, Hayashi H, Matsuzawa-Nagata N, Kurita S, Ishikura K, Ando H, Takeshita Y, Ota T, et al. A liver-derived secretory protein, selenoprotein P, causes insulin resistance. *Cell Metab.* 2010;12(5):483-95.
30. Lai KK, Kolippakkam D, and Beretta L. Comprehensive and quantitative proteome profiling of the mouse liver and plasma. *Hepatology (Baltimore, Md.)* 2008;47(3):1043-51.
31. Wu C, Jin X, Tsueng G, Afrasiabi C, and Su AI. BioGPS: building your own mash-up of gene annotations and expression profiles. *Nucleic acids research.* 2016;44(D1):D313-6.
32. Wu C, Macleod I, and Su AI. BioGPS and MyGene.info: organizing online, gene-centric information. *Nucleic acids research.* 2013;41(Database issue):D561-5.
33. Su AI, Wiltshire T, Batalov S, Lapp H, Ching KA, Block D, Zhang J, Soden R, Hayakawa M, Kreiman G, et al. A gene atlas of the mouse and human protein-encoding transcriptomes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(16):6062-7.
34. Schaefer L, and Iozzo RV. Biological functions of the small leucine-rich proteoglycans: from genetics to signal transduction. *J Biol Chem.* 2008;283(31):21305-9.

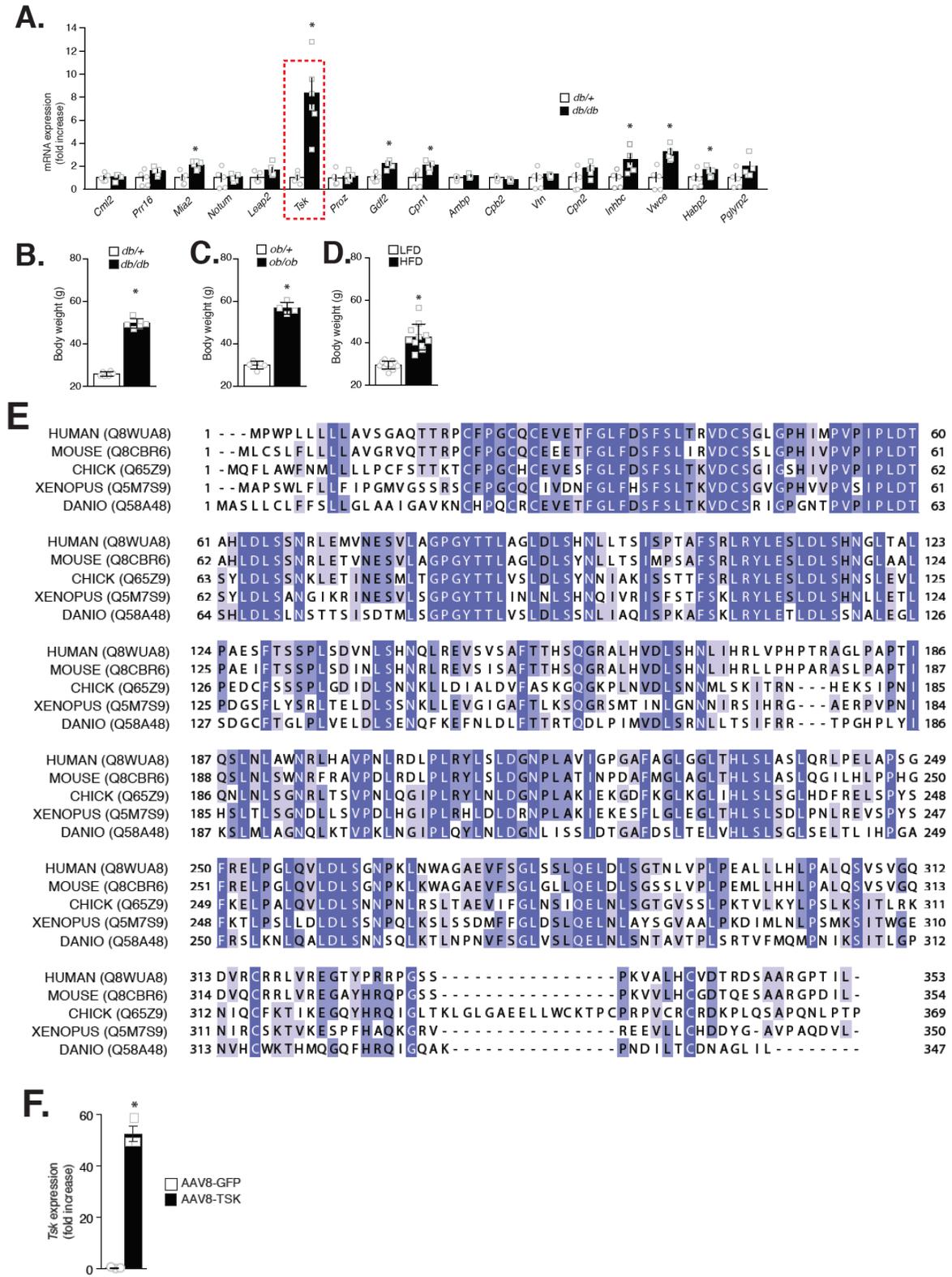
35. Ohta K, Lupo G, Kuriyama S, Keynes R, Holt CE, Harris WA, Tanaka H, and Ohnuma SI. Tsukushi functions as an organizer inducer by inhibition of BMP activity in cooperation with chordin. *Dev Cell*. 2004;7(3):347-58.
36. Ohta K, Kuriyama S, Okafuji T, Gejima R, Ohnuma S, and Tanaka H. Tsukushi cooperates with VG1 to induce primitive streak and Hensen's node formation in the chick embryo. *Development (Cambridge, England)*. 2006;133(19):3777-86.
37. Morris SA, Almeida AD, Tanaka H, Ohta K, and Ohnuma S. Tsukushi modulates Xnr2, FGF and BMP signaling: regulation of Xenopus germ layer formation. *PLoS ONE*. 2007;2(10):e1004.
38. Kuriyama S, Lupo G, Ohta K, Ohnuma S, Harris WA, and Tanaka H. Tsukushi controls ectodermal patterning and neural crest specification in Xenopus by direct regulation of BMP4 and X-delta-1 activity. *Development (Cambridge, England)*. 2006;133(1):75-88.
39. Ohta K, Ito A, Kuriyama S, Lupo G, Kosaka M, Ohnuma S, Nakagawa S, and Tanaka H. Tsukushi functions as a Wnt signaling inhibitor by competing with Wnt2b for binding to transmembrane protein Frizzled4. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(36):14962-7.
40. Niimori D, Kawano R, Felemban A, Niimori-Kita K, Tanaka H, Ihn H, and Ohta K. Tsukushi controls the hair cycle by regulating TGF-beta1 signaling. *Dev Biol*. 2012;372(1):81-7.
41. Niimori D, Kawano R, Niimori-Kita K, Ihn H, and Ohta K. Tsukushi is involved in the wound healing by regulating the expression of cytokines and growth factors. *Journal of cell communication and signaling*. 2014;8(3):173-7.
42. Grefhorst A, Elzinga BM, Voshol PJ, Plosch T, Kok T, Bloks VW, van der Sluijs FH, Havekes LM, Romijn JA, Verkade HJ, et al. Stimulation of lipogenesis by pharmacological activation of the liver X receptor leads to production of large, triglyceride-rich very low density lipoprotein particles. *J Biol Chem*. 2002;277(37):34182-90.
43. Wang Q, Sharma VP, Shen H, Xiao Y, Zhu Q, Xiong X, Guo L, Jiang L, Ohta K, Li S, et al. The hepatokine Tsukushi gates energy expenditure via brown fat sympathetic innervation. *Nature Metabolism*. 2019;1(1):252-60.
44. Caron A, Lee S, Elmquist JK, and Gautron L. Leptin and brain-adipose crosstalks. *Nat Rev Neurosci*. 2018;19(3):153-65.
45. Pagliassotti MJ. Endoplasmic reticulum stress in nonalcoholic fatty liver disease. *Annu Rev Nutr*. 2012;32(17-33).
46. Saltiel AR, and Olefsky JM. Inflammatory mechanisms linking obesity and metabolic disease. *J Clin Invest*. 2017;127(1):1-4.
47. Lee AS. The ER chaperone and signaling regulator GRP78/BiP as a monitor of endoplasmic reticulum stress. *Methods*. 2005;35(4):373-81.
48. Fofelle F, and Fromenty B. Role of endoplasmic reticulum stress in drug-induced toxicity. *Pharmacol Res Perspect*. 2016;4(1):e00211.
49. Krenkel O, Mossanen JC, and Tacke F. Immune mechanisms in acetaminophen-induced acute liver failure. *Hepatobiliary Surg Nutr*. 2014;3(6):331-43.
50. Yano K, Washio K, Tsumanuma Y, Yamato M, Ohta K, Okano T, and Izumi Y. The role of Tsukushi (TSK), a small leucine-rich repeat proteoglycan, in bone growth. *Regen Ther*. 2017;7(98-107).
51. Ahmad SAI, Anam MB, Ito N, and Ohta K. Involvement of Tsukushi in diverse developmental processes. *Journal of cell communication and signaling*. 2018;12(1):205-10.
52. Merline R, Schaefer RM, and Schaefer L. The matricellular functions of small leucine-rich proteoglycans (SLRPs). *Journal of cell communication and signaling*. 2009;3(3-4):323-35.
53. Targher G, Bertolini L, Padovani R, Rodella S, Tessari R, Zenari L, Day C, and Arcaro G. Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease and its association with cardiovascular disease among type 2 diabetic patients. *Diabetes Care*. 2007;30(5):1212-8.

54. Targher G, Bertolini L, Poli F, Rodella S, Scala L, Tessari R, Zenari L, and Falezza G. Nonalcoholic fatty liver disease and risk of future cardiovascular events among type 2 diabetic patients. *Diabetes*. 2005;54(12):3541-6.
55. Brea A, Mosquera D, Martin E, Arizti A, Cordero JL, and Ros E. Nonalcoholic fatty liver disease is associated with carotid atherosclerosis: a case-control study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25(5):1045-50.
56. Targher G, Bertolini L, Padovani R, Rodella S, Zoppini G, Zenari L, Cigolini M, Falezza G, and Arcaro G. Relations between carotid artery wall thickness and liver histology in subjects with nonalcoholic fatty liver disease. *Diabetes Care*. 2006;29(6):1325-30.
57. Tolman KG, Fonseca V, Dalpiaz A, and Tan MH. Spectrum of liver disease in type 2 diabetes and management of patients with diabetes and liver disease. *Diabetes Care*. 2007;30(3):734-43.
58. Villanova N, Moscatiello S, Ramilli S, Bugianesi E, Magalotti D, Vanni E, Zoli M, and Marchesini G. Endothelial dysfunction and cardiovascular risk profile in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology (Baltimore, Md)*. 2005;42(2):473-80.
59. Fadaei R, Poustchi H, Meshkani R, Moradi N, Golmohammadi T, and Merat S. Impaired HDL cholesterol efflux capacity in patients with non-alcoholic fatty liver disease is associated with subclinical atherosclerosis. *Sci Rep*. 2018;8(1):11691.
60. Kantartzis K, Rittig K, Cegan A, Machann J, Schick F, Balletshofer B, Fritsche A, Schleicher E, Haring HU, and Stefan N. Fatty liver is independently associated with alterations in circulating HDL2 and HDL3 subfractions. *Diabetes Care*. 2008;31(2):366-8.
61. Bril F, Sninsky JJ, Baca AM, Superko HR, Portillo Sanchez P, Biernacki D, Maximos M, Lomonaco R, Orsak B, Suman A, et al. Hepatic Steatosis and Insulin Resistance, But Not Steatohepatitis, Promote Atherogenic Dyslipidemia in NAFLD. *J Clin Endocrinol Metab*. 2016;101(2):644-52.
62. Sonmez A, Nikolic D, Dogru T, Ercin CN, Genc H, Cesur M, Tapan S, Karslioglu Y, Montalto G, Banach M, et al. Low- and high-density lipoprotein subclasses in subjects with nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Lipidol*. 2015;9(4):576-82.
63. van den Berg EH, Gruppen EG, Ebtehaj S, Bakker SJL, Tietge UJF, and Dullaart RPF. Cholesterol efflux capacity is impaired in subjects with an elevated Fatty Liver Index, a proxy of non-alcoholic fatty liver disease. *Atherosclerosis*. 2018;277(21-7).
64. Annema W, and Tietge UJ. Regulation of reverse cholesterol transport - a comprehensive appraisal of available animal studies. *Nutrition & metabolism*. 2012;9(1):25.
65. Xiong X, Wang Q, Wang S, Zhang J, Liu T, Guo L, Yu Y, and Lin JD. Mapping the molecular signatures of diet-induced NASH and its regulation by the hepatokine Tsukushi. *Molecular metabolism*. 2019;20(128-37).
66. Lau JK, Zhang X, and Yu J. Animal models of non-alcoholic fatty liver disease: current perspectives and recent advances. *J Pathol*. 2017;241(1):36-44.
67. Ito A, Shinmyo Y, Abe T, Oshima N, Tanaka H, and Ohta K. Tsukushi is required for anterior commissure formation in mouse brain. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010;402(4):813-8.
68. Tang T, Li L, Tang J, Li Y, Lin WY, Martin F, Grant D, Solloway M, Parker L, Ye W, et al. A mouse knockout library for secreted and transmembrane proteins. *Nature biotechnology*. 2010;28(7):749-55.
69. Almind K, and Kahn CR. Genetic determinants of energy expenditure and insulin resistance in diet-induced obesity in mice. *Diabetes*. 2004;53(12):3274-85.
70. West DB, Boozer CN, Moody DL, and Atkinson RL. Dietary obesity in nine inbred mouse strains. *Am J Physiol*. 1992;262(6 Pt 2):R1025-32.

71. Montgomery MK, Hallahan NL, Brown SH, Liu M, Mitchell TW, Cooney GJ, and Turner N. Mouse strain-dependent variation in obesity and glucose homeostasis in response to high-fat feeding. *Diabetologia*. 2013;56(5):1129-39.
72. Ussar S, Griffin NW, Bezy O, Fujisaka S, Vienberg S, Softic S, Deng L, Bry L, Gordon JI, and Kahn CR. Interactions between Gut Microbiota, Host Genetics and Diet Modulate the Predisposition to Obesity and Metabolic Syndrome. *Cell Metab*. 2015;22(3):516-30.
73. O'Grady JG, Schalm SW, and Williams R. Acute liver failure: redefining the syndromes. *Lancet*. 1993;342(8866):273-5.
74. Atterbury CE, Maddrey WC, and Conn HO. Neomycin-sorbitol and lactulose in the treatment of acute portal-systemic encephalopathy. A controlled, double-blind clinical trial. *Am J Dig Dis*. 1978;23(5):398-406.
75. Labbe SM, Caron A, Bakan I, Laplante M, Carpentier AC, Lecomte R, and Richard D. In vivo measurement of energy substrate contribution to cold-induced brown adipose tissue thermogenesis. *FASEB J*. 2015;29(5):2046-58.
76. Folch J, and Lees M. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem*. 1957;226(497-509).
77. Jubinville E, Routhier J, Maranda-Robitaille M, Pineault M, Milad N, Talbot M, Beaulieu MJ, Aubin S, Pare ME, Laplante M, et al. Pharmacological activation of Liver X Receptor during cigarette smoke exposure adversely affects alveolar macrophages and pulmonary surfactant homeostasis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2019.
78. Lo S, Russell JC, and Taylor AW. Determination of glycogen in small tissue samples. *J Appl Physiol*. 1970;28(2):234-6.
79. Zhang Y, Liu C, Barbier O, Smalling R, Tsuchiya H, Lee S, Delker D, Zou A, Hagedorn CH, and Wang L. Bcl2 is a critical regulator of bile acid homeostasis by dictating Shp and lncRNA H19 function. *Sci Rep*. 2016;6(20559).

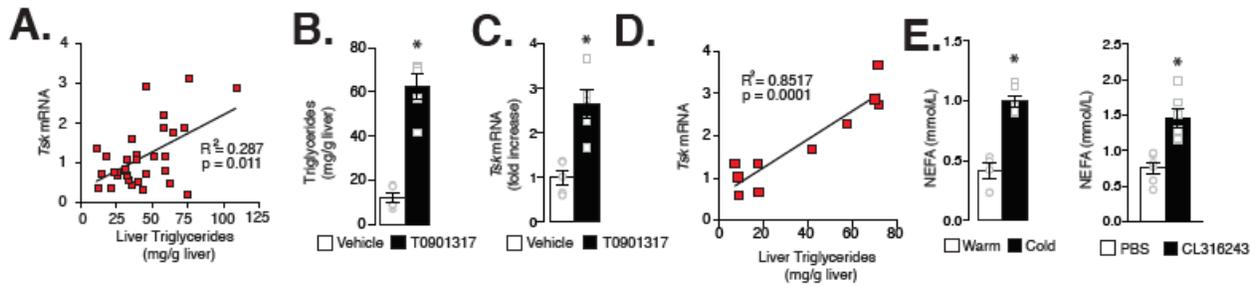
# Supplementary figures

Figure S1.



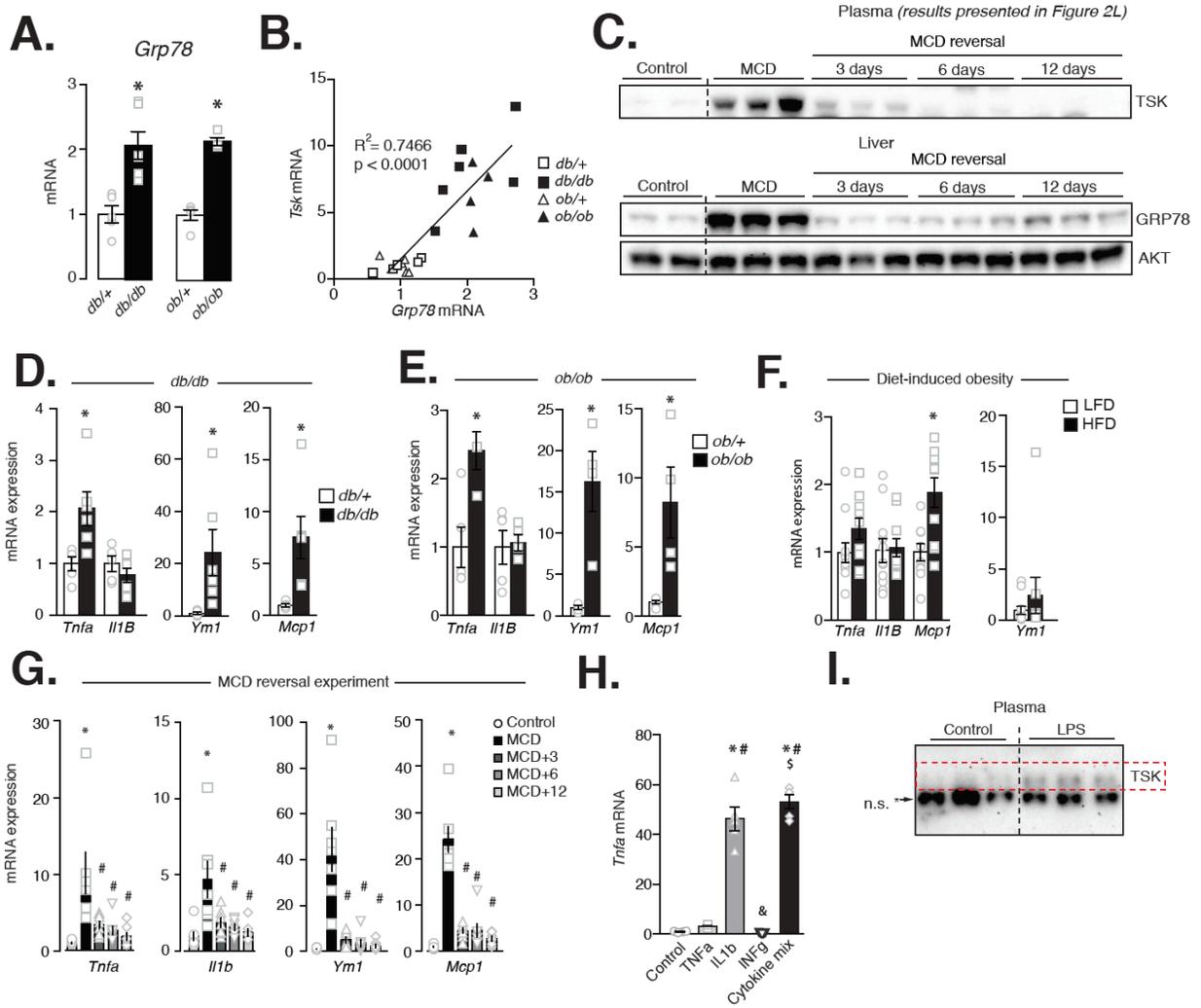
**Figure S1. *Tsk* is a hepatokine induced by obesity.** **(A)** Gene expression analysis of all the candidate genes identified in the experimental scheme described in Figure 1A. qPCR was performed in the liver of control and *db/db* mice (n=5-6/group). Data represent the mean  $\pm$  SEM. Significance was determined by two-tailed, unpaired *t* test. \**P* < 0.05 versus controls. **(B to D)** Body weight of **(B)** control and *db/db* mice (n=5-6/group) (10 weeks old), **(C)** control and *ob/ob* mice (n=4-5/group) (12 weeks old) and **(D)** LFD and HFD-fed mice (n=10/group) (11-13 weeks old mice fed a LFD or HFD for 10 weeks). Data represent the mean  $\pm$  SEM. Significance was determined by two-tailed, unpaired *t* test. \**P* < 0.05 versus controls. **(E)** Sequence alignment of TSK protein among species. **(F)** qPCR analysis of *Tsk* expression in the liver of AAV8-GFP and AAV8-TSK mice.

Figure S2.



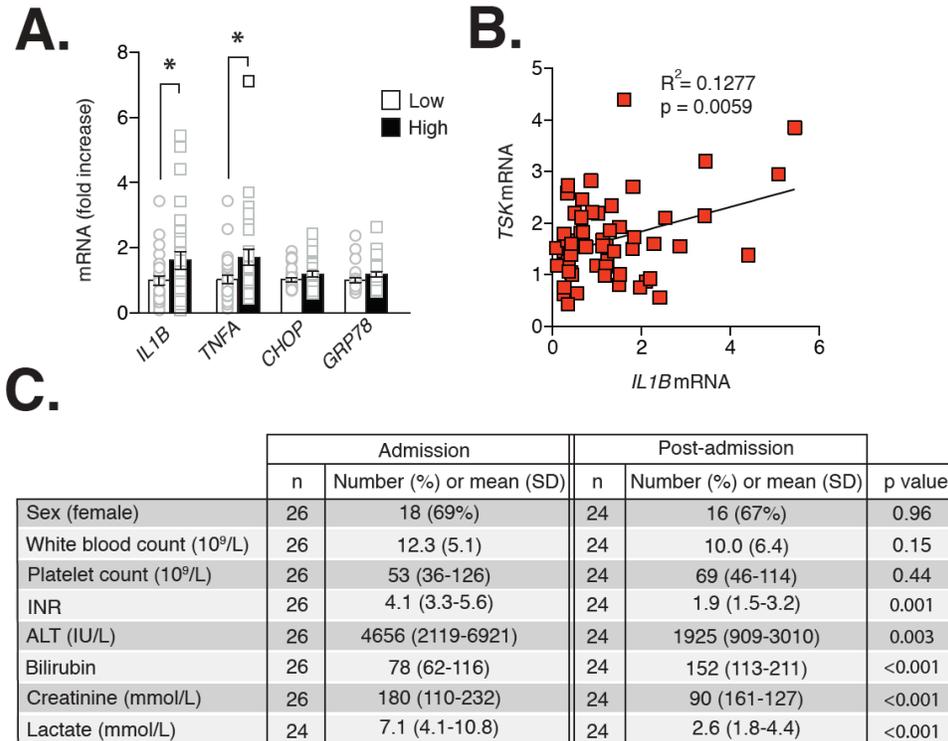
**Figure S2. *Tsk* expression correlates with liver steatosis in multiple mouse models.** (A) Mice were fed a control or MCD diet for 21 days. Following this period, MCD diet-fed mice were switched back to a control diet for 3, 6 or 12 days. Correlation between *Tsk* transcript levels and hepatic triglyceride content is presented (n=34 mice). (B) Hepatic triglyceride content measured in male mice (10 weeks old) injected with either vehicle or T0901317 (n=6 mice/group). Mice were sacrificed 24 hours after the injection. (C) qPCR analysis of *Tsk* transcript expression in the liver of male mice injected with vehicle or T0901317 (n=6 mice/group). (D) Correlation between *Tsk* transcript levels and hepatic triglyceride content in the experiment described in B (n=12). (E) Plasma level of NEFA in mice housed at thermoneutrality (30°C) or exposed to cold (10°C) for 6 hours (n=4-6/group) (left part) or in mice injected with saline or CL316243 (0.1mg/kg) (n=6/group) (right panel). In these experiments, male mice (10-12 weeks old) were used. In all the panels, data represent the mean  $\pm$  SEM. Pearson correlations (two-tailed) were calculated in panels A and D. In panels B, C, and E, significance was determined by two-tailed, unpaired *t* test. \* $P < 0.05$  versus control.

**Figure S3.**



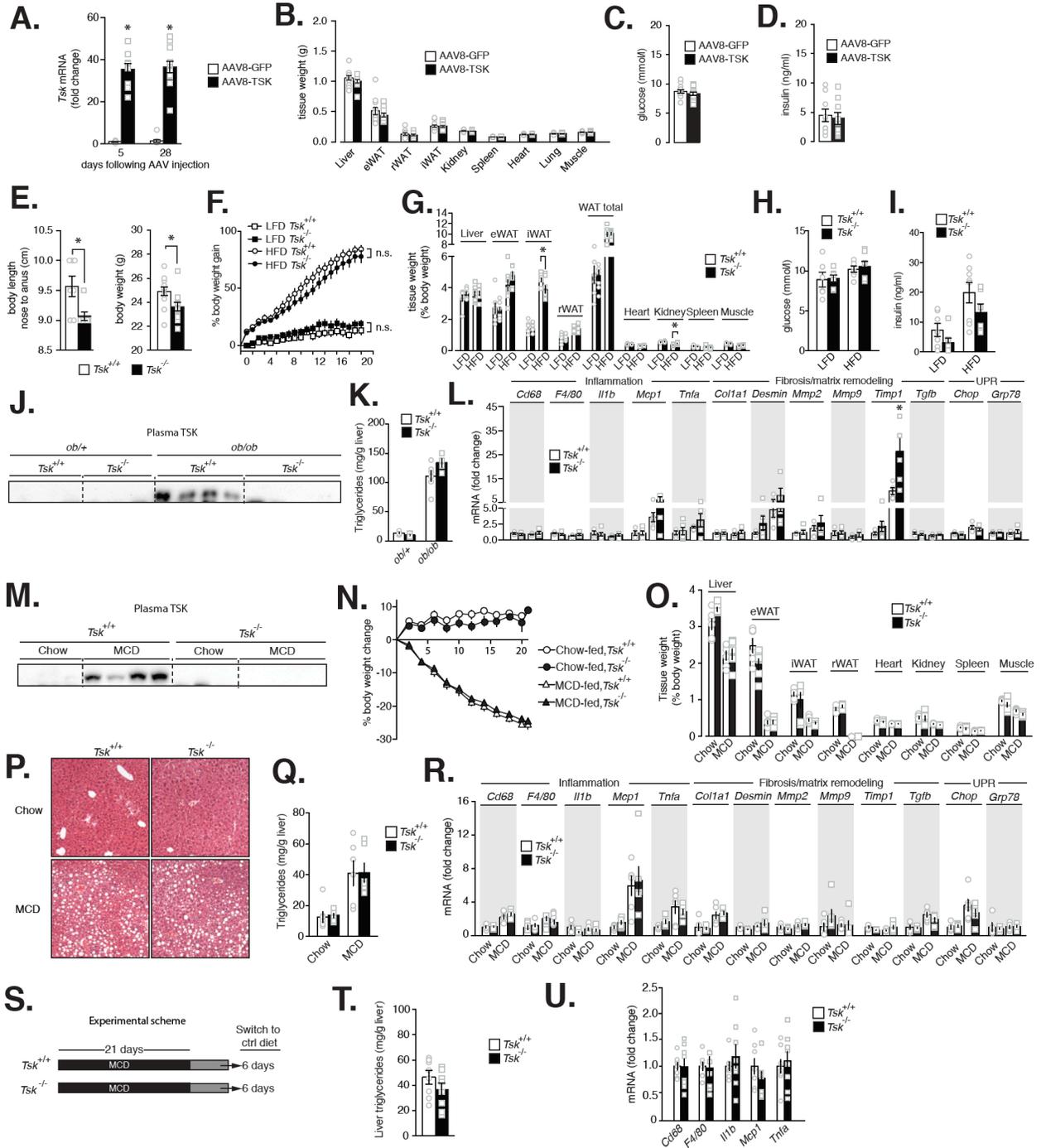
**Figure S3. ER stress and inflammatory mediators promote *Tsk* expression and release.** (A) qPCR analysis of *Grp78* transcript levels in the liver of control and *db/db* mice (n=5-6/group) and control and *ob/ob* mice (n=4-5/group). (B) Correlation between *Tsk* and *Grp78* transcript levels in the experiment described in A (n=20). (C) Western blot analyses of plasma TSK levels (top panel) and hepatic GRP78 protein in the MCD reversal study. AKT was used as a loading control. Representative samples are shown. (D to G) qPCR analyses of pro-inflammatory gene expression in the liver of (D) control and *db/db* mice (n=5-6/group), (E) control and *ob/ob* mice (n=4-5/group), (F) LFD- and HFD-fed mice (n=10/group) and (G) mice included in the MCD reversal study (n=7/group). (H) qPCR analysis of *Tnfa* transcript levels in AML12 cells treated with TNF $\alpha$  (5ng/ml), IL1 $\beta$  (20ng/ml), IFN $\gamma$  (5000U/ml) or a mixture of these cytokines for 8 hours (n=5/condition). (I) Western blot analysis of plasma TSK levels in mice injected or not with LPS (2mg/kg). Plasma was collected 12 hours after the injection. In this panel, an arrow point towards a non-specific band (n.s.). In all panels, data represent the mean  $\pm$  SEM. In panels A, D, E and F, significance was determined by two-tailed, unpaired *t* test. \**P* < 0.05 versus controls. Pearson correlations (two-tailed) were calculated in panels B. In panels G and H, One-way ANOVA with multiple comparisons (Tukey's multiple comparison) were performed. In panel G, \**P* < 0.05 versus control and # *P* < 0.05 versus MCD diet. In panel H, \* denotes significance (*P* < 0.05) versus control, # denotes significance (*P* < 0.05) versus TNF $\alpha$ , & denotes significance (*P* < 0.05) versus IL1 $\beta$  and \$ denotes significance (*P* < 0.05) versus IFN $\gamma$ .

**Figure S4.**



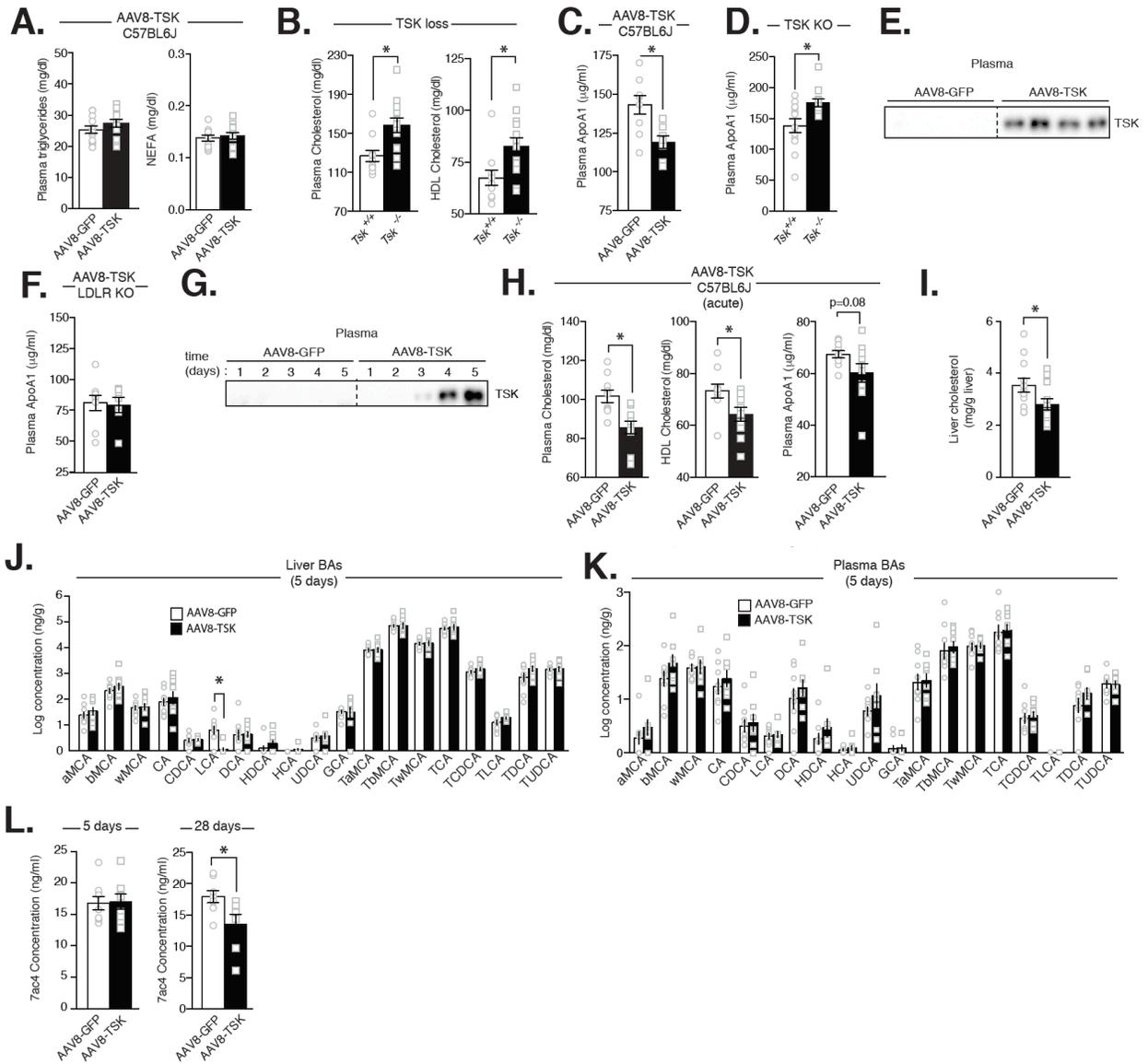
**Figure S4. TSK levels are increased in response to steatosis and liver damage in humans. (A)** mRNA expression levels of pro-inflammatory markers and ER stress markers measured in liver samples isolated from humans with Low or High hepatic triglycerides (n=29/group). Data represent the mean  $\pm$  SEM. Significance was determined by two-tailed, unpaired *t* test. \**P* < 0.05 versus controls. **(B)** Correlation calculated between hepatic *TSK* and *IL1B* transcript levels in the human cohort (n=58). Pearson correlations (two-tailed) was calculated. **(C)** Characteristics of the ALF patients included in the study. Significance for sex was determined by chi squared test. For non-parametric variables (platelet count, INR, ALT, bilirubin, creatinine, lactate) significance was determined using a Wilcoxon rank sum test. For parametric variables (white blood cell count), significance was determined by two-tailed, unpaired *t* test.

**Figure S5.**



**Figure S5. TSK does not affect NAFLD development.** (A) Hepatic *Tsk* transcript expression 5 days and 28 days following the injection AAV8-GFP and AAV8-TSK. (B) Tissue weight of AAV8-GFP and AAV8-TSK mice (n=12/group). Mice were sacrificed 6 weeks following AAV8 injection. (C) Fasting glucose and (D) insulin levels measured in plasma of AAV8-GFP and AAV8-TSK mice (n=9-12/group). (E) Body length (left) and body weight (right) of wild-type (*Tsk*<sup>+/+</sup>) and knockout (*Tsk*<sup>-/-</sup>) (n=7-12/group). (F) Body weight gain of wild-type (*Tsk*<sup>+/+</sup>) and knockout (*Tsk*<sup>-/-</sup>) (n=6-8/group) fed a LFD or a HFD for 19 weeks (G) Tissue weight of wild-type (*Tsk*<sup>+/+</sup>) and knockout (*Tsk*<sup>-/-</sup>) mice fed either LFD or HFD diet for 19 weeks (n=6-8/group). Results are presented as % of body weight. (H) Fasting glucose and (I) insulin levels measured in plasma of wild-type (*Tsk*<sup>+/+</sup>) and knockout (*Tsk*<sup>-/-</sup>) mice fed either LFD or HFD diet for 19 weeks (n=6-8/group). (J) Western blot analysis of plasma TSK levels in wild-type (*Tsk*<sup>+/+</sup>) and knockout (*Tsk*<sup>-/-</sup>) mice bred to the *ob/ob* background (n=4-6/group). Male mice were sacrificed at 16-19 weeks of age. Representative samples are shown. (K) Hepatic triglyceride content and (L) qPCR analyses of gene expression measured in the liver of mice described in J. (M) Western blot analysis of plasma TSK levels in wild-type (*Tsk*<sup>+/+</sup>) and knockout (*Tsk*<sup>-/-</sup>) mice fed a MCD diet for 21 days (n=6/group). Representative samples are shown. (N) Body weight and (O) tissue weight of wild-type (*Tsk*<sup>+/+</sup>) and knockout (*Tsk*<sup>-/-</sup>) mice fed MCD diet for 21 days (n=6/group). (P) Hematoxylin and eosin stained sections and (Q) hepatic triglyceride content of liver samples collected from wild-type (*Tsk*<sup>+/+</sup>) and knockout (*Tsk*<sup>-/-</sup>) mice fed MCD diet for 21 days. (R) qPCR analysis of various genes in the liver of wild-type (*Tsk*<sup>+/+</sup>) and knockout (*Tsk*<sup>-/-</sup>) mice fed MCD diet for 21 days (n=6/group). (S) Experimental scheme of the MCD diet reversal experiments. Mice were fed a MCD diet for 21 days before being switched back to a control diet for 6 days (n=8/group). (T) Hepatic triglyceride content and (U) qPCR analyses of pro-inflammatory gene expression measured in the liver of mice included in the MCD reversal study described in P (n=8/group). In all panels, data are presented as the mean ± SEM. In panels A to E, T and U, significance was determined by two-tailed, unpaired *t* test. \**P* < 0.05 versus controls. In panels F to I, K, L, N, O, Q and R, two-way ANOVA with multiple comparisons was performed between wild-type (*Tsk*<sup>+/+</sup>) and knockout (*Tsk*<sup>-/-</sup>) mice for each diet. Only the differences between genotypes within each diet are presented as significantly different (\**P* < 0.05 versus wild-type (*Tsk*<sup>+/+</sup>) mice).

**Figure S6.**



**Figure S6. TSK impacts on systemic cholesterol homeostasis.** **(A)** Circulating triglycerides and NEFA levels measured in samples collected from C57BL/6J mice injected with AAV8-GFP or AAV8-TSK (n=12/group). Blood samples were analysed from mice 4 weeks following AAV8 injection. **(B)** Total cholesterol and HDL-cholesterol levels measured in plasma samples collected from wild-type (*Tsk<sup>+/+</sup>*) and knockout (*Tsk<sup>-/-</sup>*) mice (n=11-13/group). **(C-D)** Plasma ApoA1 levels measured in **(C)** C57BL/6J mice injected with AAV8-GFP or AAV8-TSK (n=9/group) and in **(D)** in wild-type (*Tsk<sup>+/+</sup>*) and knockout (*Tsk<sup>-/-</sup>*) mice (n=12/group). **(E)** Western blot analysis and **(F)** ApoA1 levels measured in plasma of LDLR KO mice injected with AAV8-GFP or AAV8-TSK (n=7-9/group). **(G)** Western blot analysis of plasma samples collected from mice injected with AAV8-GFP or AAV8-TSK. Blood was collected 1, 2, 3, 4 and 5 days following AAV8 injection. Representative samples are shown. **(H)** Total cholesterol, HDL-cholesterol and ApoA1 levels measured in plasma samples collected from mice 3 days following the injection with AAV8-GFP or AAV8-TSK (n=10/group). **(I)** Hepatic cholesterol content measured 28 days after the injection of AAV8-GFP or AAV8-TSK. **(J-K)** Bile acid profiling in **(J)** the liver and **(K)** the plasma of mice sacrificed 5 days (n=8-10/group) following the injection with AAV8-GFP or AAV8-TSK. Values are log transformed. **(L)** Circulating levels of 7-alpha-hydroxy-4-cholesten-3-one (7aC4) measured in the plasma of mice sacrificed 5 days or 28 days following the injection with AAV8-GFP or AAV8-TSK (n=8-10/group). In all panels, data are presented as the mean  $\pm$  SEM. In all panels, excepted panel G, significance was determined by two-tailed, unpaired *t* test. \**P* < 0.05 versus control.

## Chapitre 2

### THE HEPATOKINE TSK DOES NOT AFFECT BROWN FAT THERMOGENIC CAPACITY, BODY WEIGHT GAIN AND GLUCOSE HOMEOSTASIS

Mathilde Mouchiroud<sup>1</sup>, Étienne Camiré<sup>1</sup>, Manal Aldow<sup>1</sup>, Alexandre Caron<sup>2</sup>, Éric Jubinville<sup>1</sup>, Laurie Turcotte<sup>1</sup>, Inès Kaci<sup>1</sup>, Marie-Josée Beaulieu<sup>1</sup>, Christian Roy<sup>1</sup>, Sébastien M. Labbé<sup>1,3</sup>, Thibaut V. Varin<sup>1,4</sup>, Yves Gélinas<sup>1</sup>, Jennifer Lamothe<sup>1</sup>, Frédéric Guénard<sup>4</sup>, Jocelyn Trottier<sup>4</sup>, Patricia Mitchell<sup>1</sup>, William T. Festuccia<sup>5</sup>, Philippe Joubert<sup>1</sup>, Christopher F. Rose<sup>6</sup>, Constantine J. Karvellas<sup>7</sup>, Olivier Barbier<sup>8</sup>, Mathieu C. Morissette<sup>1,9</sup>, André Marette<sup>1,4,9</sup> and Mathieu Laplante<sup>1,9,10\*</sup>

<sup>1</sup>Centre de recherche de l'Institut universitaire de cardiologie et de pneumologie de Québec - Université Laval (CRIUCPQ), 2725 Chemin Ste-Foy, Québec, QC, Canada, G1V 4G5

<sup>2</sup>Division of Hypothalamic Research, Department of Internal Medicine, The University of Texas Southwestern Medical Center, 5323 Harry Hines Boulevard, Dallas, TX, USA, 75390

<sup>3</sup>IPS Thérapeutique, 3035 Boulevard Industriel, Sherbrooke, QC, Canada, J1L 2T9

<sup>4</sup>Institut sur la nutrition et les aliments fonctionnels (INAF), Université Laval, 2440 Boulevard Hochelaga Suite 1710, Québec, QC, Canada, G1V 0A6

<sup>5</sup>Department of Physiology and Biophysics, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil, 05508-000

<sup>6</sup>Hepato-Neuro Laboratory, Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM), 900, rue Saint-Denis - Tour Viger R08.422, Montréal, QC, Canada, H2X 0A9

<sup>7</sup>Division of Gastroenterology (Liver Unit), Department of Critical Care Medicine, School of Public Health Science, University of Alberta, 1-40 Zeidler Ledcor Building, 8540 - 112 Street, Edmonton, AB, Canada, T6G 2X8,

<sup>8</sup>Laboratory of Molecular Pharmacology, Endocrinology-Nephrology axis, Centre de recherche du Centre Hospitalier Universitaire de Québec, & Faculty of Pharmacy, Université Laval, 2705 Boulevard Laurier, Québec, QC, Canada, G1V 4G2

<sup>9</sup>Département de Médecine, *Université Laval*, 1050 avenue de la Médecine, Québec, QC, Canada, G1V0A6

<sup>10</sup>Centre de recherche sur le cancer de l'Université Laval, Université Laval, 9 rue McMahon, Québec, QC, Canada, G1R 3S3

« Copyright © 2019 Elsevier GmbH  
From *Molecular Metabolism*, Vol. 30, 2019; 181-194  
Reprinted with permission from *Elsevier GmbH*.”

Article publié dans *Molecular Metabolism* 30 : 184-191, 2019

## **Avant-propos**

Cet article étudie l'implication de TSK dans la capacité thermogénique du tissu adipeux brun, l'augmentation du poids corporel et l'homéostasie du glucose. L'ensemble de ce travail a été réalisé sous la direction du Dr. Mathieu Laplante. Cette étude implique mon entière participation quant à la réalisation de l'ensemble des étapes menant à l'aboutissement de ces travaux, soit la planification, les décisions relatives aux mesures effectuées, la mesure des variables plasmatiques et tissulaires et l'écriture du manuscrit. Travaillant sur une nouvelle protéine, de nombreux résultats ont été insérés en tant que matériel supplémentaire ou n'ont pas pu être intégrés dans l'article. Suite aux corrections du directeur, l'article a été révisé par l'ensemble des coauteurs et a été soumis aux éditeurs de la revue *Molecular Metabolism*. Cet article a été accepté pour fin de publication en septembre 2019 et publié en novembre 2019.

## Résumé

**Objectifs** : Les hépatokines sont des protéines sécrétées par le foie qui ont un impact sur les fonctions du foie et de divers tissus par la signalisation autocrine, paracrine et endocrine. Récemment, Tsukushi (TSK) a été identifiée comme une nouvelle hépatokine induite par l'obésité et l'exposition au froid. Il a été proposé que TSK contrôle l'innervation sympathique et la thermogénèse dans le tissu adipeux brun (TAB) et que la perte de TSK protège contre l'obésité induite par l'alimentation et améliore l'homéostasie du glucose. Nous rapportons ici l'impact de la suppression et / ou de la surexpression de TSK sur la capacité thermogénique du TAB, la régulation du poids corporel et l'homéostasie du glucose. **Méthodes** : Nous avons mesuré l'expression des gènes thermogéniques et des marqueurs d'innervation et d'activation du TAB chez des souris TSK nulles et TSK surexprimeuses. Le poids corporel, la température corporelle et les paramètres de l'homéostasie du glucose ont également été évalués dans le contexte de la perte et de la surexpression de TSK. **Résultats** : La perte de TSK n'a pas affecté l'activation thermogénique du TAB. Nous avons constaté que les souris TSK nulles n'étaient pas protégées contre le développement de l'obésité et ne présentaient pas d'amélioration de la tolérance au glucose. La surexpression de TSK a également échoué à moduler la thermogénèse, le gain de poids corporel et l'homéostasie du glucose chez la souris. **Conclusions** : TSK n'est pas un régulateur important de la thermogénèse du TAB et il est peu probable qu'elle représente une cible efficace pour prévenir l'obésité et améliorer l'homéostasie du glucose.

## Abstract

**Objectives:** Hepatokines are proteins secreted by the liver that impact the functions of the liver and various tissues through autocrine, paracrine, and endocrine signaling. Recently, Tsukushi (TSK) was identified as a new hepatokine that is induced by obesity and cold exposure. It was proposed that TSK controls sympathetic innervation and thermogenesis in brown adipose tissue (BAT) and that loss of TSK protects against diet-induced obesity and improves glucose homeostasis. Here we report the impact of deleting and/or overexpressing TSK on BAT thermogenic capacity, body weight regulation, and glucose homeostasis.

**Methods:** We measured the expression of thermogenic genes and markers of BAT innervation and activation in TSK-null and TSK-overexpressing mice. Body weight, body temperature, and parameters of glucose homeostasis were also assessed in the context of TSK loss and overexpression. **Results:** The loss of TSK did not affect the thermogenic activation of BAT. We found that TSK-null mice were not protected against the development of obesity and did not show improvement in glucose tolerance. The overexpression of TSK also failed to modulate thermogenesis, body weight gain, and glucose homeostasis in mice.

**Conclusions:** TSK is not a significant regulator of BAT thermogenesis and is unlikely to represent an effective target to prevent obesity and improve glucose homeostasis.

## 1. Introduction

The liver plays central roles in regulating systemic metabolism. Alteration in liver functions linked to chronic overfeeding and obesity contributes to the development of several health issues including insulin resistance, type 2 diabetes, dyslipidemias, hypertension and cardiovascular diseases [1, 2]. Recent evidence indicates that the liver impacts on metabolism through the secretion of specific proteins. These proteins, often referred to as hepatokines, are secreted by the liver and impact on the functions of the liver per se and several extrahepatic tissues through autocrine, paracrine and endocrine mechanisms [3-5]. It is now well documented that the secretion of several hepatokines is altered in response to obesity and that some of these circulating proteins can directly contribute to the development of obesity-related metabolic disorders [3-5].

Tsukushi (TSK) is an atypical member of the small leucine-rich proteoglycan (SLRP) family that controls developmental processes in various models [6]. Recently, two groups, including our, reported the identification of TSK as a new hepatokine [7-9]. These studies revealed that TSK is a liver-derived factor whose expression and circulating levels are strongly induced in response to obesity and cold exposure. Triglyceride deposition in the liver, a common feature associated with obesity and acute cold challenge, strongly associates with *Tsk* expression and TSK release by the liver [7, 9]. It was also shown that inflammation and endoplasmic reticulum (ER) stress, two conditions intimately linked to excessive lipid deposition in the liver, both promote *Tsk* expression [7]. Collectively, these findings indicate that TSK is a new hepatokine whose circulating levels are linked to hepatic fat accumulation, inflammation and ER stress.

The function of TSK in metabolism is only emerging. A recent study proposed a role for TSK in regulating the activation of brown adipose tissue (BAT), a key organ controlling thermogenesis, energy balance and glucose metabolism [8]. Using TSK null mice, Wang et al. reported that TSK loss increased sympathetic innervation and thermogenesis in BAT, protected mice against diet-induced obesity and improved glucose homeostasis [8]. Based on these findings, they proposed that TSK could be part of a negative feedback mechanism emerging from the liver to repress thermogenesis in BAT and reduce energy expenditure. TSK was thus suggested as a potential target for therapeutic intervention in metabolic diseases. Here, we provide data showing that the loss of TSK does not affect BAT thermogenic capacity. We found that TSK null mice are not protected against the development of obesity and do not show improvement in glucose metabolism.

Overexpression of TSK also failed in modulating thermogenesis, body weight and glucose tolerance. Thus, we conclude that TSK is not a significant regulator of BAT thermogenesis and that TSK is unlikely to represent an effective target to prevent obesity and improve glucose homeostasis.

## **2. Material and methods**

### **2.1. Animal care.**

All experimental protocols were approved by the Animal Ethics Committee of Université Laval (CPAUL) and in accordance with the guidelines of the Canadian Council on Animal Care. All mice were on a C57BL/6J background and were purchased from the Jackson laboratory (stock number 000664). Obese mice (*ob/ob*; stock number 000632) were purchased from the Jackson Laboratory. Mice were maintained on a 12:12-h light-dark cycle (lights on 0600-1800), while individually housed in ventilated cages at an ambient temperature of 23±1°C. Unless stated, all mice were fed ad libitum chow. The low-fat diet (LFD) (10% kCal from fat, D12450B) and high-fat diet (HFD) (60% kCal from fat, D12492) were purchased from Research Diets.

### **2.2. Generation of Tsk knockout mice.**

Tsk knockout mice were obtained from Genentech/Lexicon and were generated by homologous recombination, as described [10]. The insertion of the targeting vector was validated by PCR and Southern blotting. The *Tsk* wild-type allele was amplified using the following primers: forward 5'-GACATCAATCTGAGCCATAAC-3', reverse 5'-ATGAAGGCATCTGGGTTGATG-3'. The integration of the Neo Cassette in the mutant *Tsk* allele was measured using the following primers: forward 5'-GTAGACTCTCCACAGGCATTGG-3', reverse 5'-GCAGCGCATCGCCTTCTATC-3'. Mice were backcrossed for 6 generations onto C57BL6/J before being used experimentally. All the experiments were performed using age-matched littermates produced by breeding Tsk heterozygote mice.

### **2.3. Overexpression of TSK in mice.**

AAV vectors were packaged by the Canadian Neurophotonics Platform (Centre de recherche CERVO, Québec, Canada). Briefly, viral particles were generated from a triple transfection of HEK 293T17 cells and collected from the culture media 5 days post-transfection. They were concentrated using a TFF setup (Vivaflow 50R 100K MWCO, Sartorius) and then purified by iodixanol gradient and ultracentrifugation. Purified particles were collected in suspension buffer (PBS 320 mM NaCl, 5% D-Sorbitol and 0.001% Pluronic

F-68) and titrated by qPCR (TaqMan) using ITR-based probe and primers. Physical titer and purity were confirmed by separating same volumes of AAV on a 10% SDS-PAGE (stain free—BioRad) in Tris-Glycine-SDS buffer. Male C57BL6/J mice (10 weeks) were injected with 100 $\mu$ L of AAV8-GFP or AAV8-TSK via the tail vein (1 x 10<sup>11</sup> PFU/mouse). The animals were sacrificed at the indicated time following the injection.

#### 2.4. Quantitative real-time PCR.

Total mRNA was isolated from tissues using the RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (Qiagen, 74104). The RNA concentrations were estimated from absorbance at 260 nm. cDNA synthesis was performed using the iScript™ Advanced cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR (Bio-Rad) as described. mRNA extraction and cDNA synthesis were performed following the manufacturer's instructions. cDNA was diluted in DNase-free water (1:15) before quantification by real-time PCR. mRNA transcript levels were measured in duplicate samples using CFX96 or CFX384 touch™ real-time PCR (Bio-Rad, Mississauga, ON, Canada). Chemical detection of the PCR products was achieved with SYBR Green (Bio-Rad, 172-5271). At the end of each run, melt curve analyses were performed, and representative samples of each experimental group were run on agarose gel to ensure the specificity of amplification. Gene expression was corrected for the expression level of reference gene. The following primers were used.

Gene	Sens	Anti-sens
<i>Actb</i>	CTCTAGACTTCGAGCAGGAG	AGAGTACTTGCGCTCAGGAG
<i>Arbp</i>	AGAAACTGCTGCCTCACATC	CATCACTCAGAATTTCAATGG
<i>Cidea</i>	AAAGGGACAGAAATGGACAC	CCTCAGCAGATTCTTAACAC
<i>Dio2</i>	CAGTGTGGTGCACGTCTCCAATC	TGAACCAAAGTTGACCACCAG
<i>Pgc1a</i>	AAGATCAAGGTCCCAGGCAGTAG	TGTCCGCGTTGTGTCAGGTC
<i>Tsk</i>	TGCAGGGCATCCTCCATCTA	GCCTGAAAACACCTCAGCTC
<i>Ucp1</i>	GCAGTGTTTCATTGGGCAGCC	GGACATCGCACAGCTTGGTAC
<i>Actb</i>	CTCTAGACTTCGAGCAGGAG	AGAGTACTTGCGCTCAGGAG

#### 2.5. Glucose tolerance test (GTT) and insulin tolerance test (ITT).

For the GTT, mice were fasted 6 hours and were injected ip with 1 g/kg of D-Glucose. For the ITT, animals were fasted for 6 hours and were injected ip with 0.75 U/kg of human recombinant insulin (Humulin, Lilly, Canada). Blood samples were collected from the tail vein and glucose was measured using a glucometer (Roche, Accu-Chek Performa).

## **2.6. Body composition analysis.**

Body composition was measured by dual-energy X-ray absorptiometry (DEXA) using the PIXIMUS mouse densitometry apparatus (Lunar Corporation, Madison, WI, USA) under isoflurane.

## **2.8. Body temperature measurement.**

Rectal temperature was measured in mice using a digital thermometer with a precision of 0.1°C (Mansfield, Montreal, Qc, Canada).

## **2.9. Western blotting.**

Tissues were lysed with Triton-X 100 containing lysis buffer (50 mM HEPES, pH 7.4, 2 mM EDTA, 10 mM sodium pyrophosphate, 10 mM sodium glycerophosphate, 40 mM NaCl, 50 mM NaF, 2 mM sodium orthovanadate, 1% Triton-X 100, 0.1% sodium lauryl sulfate and 1% sodium deoxycholate and one tablet of EDTA-free protease inhibitors per 25 ml). Tissues were rotated at 4°C for 10 minutes and then the soluble fractions of cell lysates were isolated by centrifugation for 10 min in a microcentrifuge. Protein levels were then quantified using Bradford reagents and analyzed by Western blotting. Samples were loaded on 10% Tris-Glycine precast gels (Life Technologies). Proteins were transferred to PVDF membranes blocked in 5% milk diluted in PBS-Tween and incubated with their primary antibody overnight at 4°C. The following antibodies were used:  $\beta$ -Actin (4967, Cell Signaling Technology, dilution 1:1000), phospho-PKA substrate (RRXS\*/T\*)(100G7E) (9624S), Tyrosine hydroxylase antibody (NB300-109, Novus, dilution 1:1000). Secondary antibodies were purchased from Cell Signaling Technology (7076S and 7074S) and diluted 1:5000. Amersham ECL Western Blotting Detection Reagent (RPN2106) was used to image the blots.

### 3. Results

#### 3.1. Loss of TSK does not affect BAT thermogenic capacity.

TSK deficiency was recently shown to affect BAT function in mice [8]. An increase in thermogenic gene expression was reported in TSK-null animals, an effect that was linked to elevated sympathetic innervation and to a reduction in lipid deposition in BAT. To test the impact of TSK loss on BAT metabolism, we used the full-body TSK-null mouse model that was previously developed [10]. Confirming the validity of the model, *Tsk* expression was undetectable in the liver of TSK knockout mice (Figure 1A). We next measured the expression of classical thermogenic markers in BAT, including *Uncoupling protein 1* (*Ucp1*), *Cell death activator cide-A* (*Cidea*), *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma COACTIVATOR 1a* (*Pgc1a*), and *Type II iodothyronine deiodinase* (*Dio2*). As shown in Figure 1B, none of these genes were differentially expressed in the BAT of TSK-null mice as compared to the expression in littermate controls. This was observed in mice fed either chow or HFD. We next measured the phosphorylation of protein kinase A (PKA) substrates and tyrosine hydroxylase (TH) in BAT as markers of BAT activation and innervation. In contrast to the findings of Wang et al., we found no increase in the phosphorylation of PKA substrates and TH levels in TSK knockout mice (Figure 1C). In fact, we even observed a reduction in TH protein in the BAT of chow-fed mice (Figure 1C and 1D). No difference in BAT weight and body temperature between wild-type and knockout mice further confirmed the absence of thermogenic induction in the BAT of TSK-null mice (Figure 1E and 1F). To test whether TSK might specifically have an impact on BAT activation in response to cold, wild-type and TSK-null mice were housed at 10 °C for 24 h. As shown in Figure S1, TSK loss did not increase the expression of the thermogenic gene, the phosphorylation of PKA substrates, or TH levels in BAT. The weight of BAT did not differ between wild-type and TSK null mice. Altogether, these results do not support a role for TSK in regulating BAT thermogenesis in mice.

#### 3.2. Loss of TSK does not protect mice against the development of obesity.

The elevation in BAT activity caused by TSK deletion was proposed to be sufficient to promote energy expenditure and prevent diet-induced obesity in mice [8]. To test the impact of TSK on body weight regulation, wild-type and TSK knockout littermates were fed either a LFD or a HFD. At the beginning of the study, TSK-null animals were already smaller than wild-type littermates, a phenotype consistent with the established role of TSK in regulating development in mice (Figure. 2A) [6]. In contrast to the results presented by Wang

et al., TSK-null animals were not protected against diet-induced obesity. As shown in Figure 2B, TSK wild-type and TSK knockout mice gained the same amount of weight in response to LFD or HFD. Supporting these findings, DEXA analyses revealed no difference in lean and fat mass between the wild-type and TSK-null mice (Figure 2C and 2D). To test whether TSK loss could have an impact on body weight gain in severely obese mice, TSK wild-type and TSK knockout mice were established into the *ob/+* and *ob/ob* background, respectively. Although TSK-null mice were smaller than littermate controls (Figure 2E), the body weight gain measured in the *ob/ob* background was not affected by the loss of TSK (Figure 2F). These results further confirm that loss of TSK does not protect mice against the development of obesity.

### **3.3. Loss of TSK does not improve glucose homeostasis.**

The loss of TSK was previously reported to improve glucose tolerance in mice [8]. To define the impact of TSK loss on glucose metabolism, we next performed the GTT in TSK wild-type TSK and knockout mice fed either a LFD or a HFD. We observed a mild deterioration in glucose tolerance in TSK knockout mice fed a LFD, but this effect was not statistically significant when the area under the curve was calculated (Figure 3A and B). More importantly, we did not find an impact of TSK loss on glucose intolerance induced by HFD feeding (Figure 3A and B). To test whether TSK loss could have an impact on glucose homeostasis in genetically obese mice, we performed GTT in TSK wild-type and TSK knockout mice bred into the *ob/ob* background. As presented in Figure 3C and D, we found no effect of TSK loss on glucose tolerance in this more severe model either. Altogether, these results indicate that TSK does not improve glucose homeostasis in two well-established mouse models of obesity.

### **3.4. Overexpression of TSK does not affect BAT thermogenic capacity, body weight and glucose homeostasis.**

To further examine the functions of TSK in regulating metabolism, complementary experiments were performed in TSK-overexpressing mice. Briefly, mice were infected with AAV serotype 8 (AAV8) coding for either a control green fluorescent protein (GFP) or a full-length TSK. As expected, we detected high levels of TSK in the plasma of mice injected with AAV8-TSK (Figure 4A). As observed in TSK-null mice, TSK overexpression did not affect the expression of thermogenic genes in BAT (Figure 4B). We did not observe any change in BAT weight or obvious differences in BAT morphology between AAV8-GFP and AAV8-TSK mice (Figure 4C and D). Moreover, we measured no difference in body temperature

following TSK overexpression (Figure 4E). Consistent with these findings, we found no effect of TSK overexpression on body weight gain (Figure 4F). We next sought to define the impact of TSK overexpression on glucose homeostasis. As depicted in Figure 4G and H, TSK overexpression did not have any impact on glucose tolerance and insulin sensitivity. Overall, these results indicate that TSK overexpression does not affect BAT activation, body weight, and glucose homeostasis in mice.

## 4. Discussion

Hepatokines are proteins released by the liver that impact on various organs to control systemic metabolism. The secretion of several hepatokines is altered in response to obesity, and growing evidence indicates that these changes can contribute to the development of glucose intolerance, insulin resistance, and cardiovascular diseases [3-5]. These observations suggest that hepatokines could represent new targets for the treatment of obesity-related metabolic diseases.

TSK is a newly identified hepatokine whose circulating levels are induced by obesity and cold exposure [7-9]. Liver steatosis, a common feature associated with obesity and acute cold challenge, strongly associates with circulating TSK in several mouse models [7, 9]. Interestingly, inflammation and ER stress, two conditions linked to excessive lipid deposition in the liver, both promote hepatic *Tsk* expression in mice [7]. Generally, these findings support the idea that TSK is produced when the liver faces various stressful conditions linked to excessive lipid flux in the tissue. Although both groups reporting the discovery of TSK generally agree on the conditions promoting its release by the liver, they also proposed different physiological roles for this hepatokine. Gain and loss of function studies performed in our laboratory revealed that TSK impacts on systemic cholesterol homeostasis [7]. In particular, we showed that TSK reduced circulating HDL-cholesterol, lowered cholesterol efflux capacity and decreased cholesterol to bile acid conversion in the liver. Based on these findings, we proposed that TSK might be part of a biological response aimed at limiting reverse cholesterol transport to the liver when hepatocytes are exposed to elevated lipid flux, inflammation and ER stress. Alternatively, because TSK is rapidly induced following cold exposure, a phenomenon that we found to be linked to the acute steatosis that develops upon sympathetic activation, a role for TSK in the regulation of thermogenesis was investigated [8]. In this study, Wang et al. reported that TSK deletion increased sympathetic innervation and thermogenesis in BAT, protected mice against diet-induced obesity and improved glucose homeostasis [8]. They proposed that TSK could be part of a negative feedback mechanism emerging from the liver to repress thermogenesis in BAT and reduce energy expenditure.

With our past experience in the study of BAT and energy balance [11-17], we intuitively tested the implication of TSK on these parameters early following the identification of TSK, with the objective to test the possible role of this protein in the control of energy metabolism. Here, we provide compelling evidence showing that TSK does not impact

thermogenic activation of BAT in various experimental conditions. These results clearly show that neither the loss nor the overexpression of TSK has any effect on the expression of classical markers of thermogenesis in BAT. In these experiments, TSK did not affect body temperature and body weight gain in both lean and obese mice. Moreover, we did not observe any significant impact of TSK loss or overexpression on glucose homeostasis. Collectively, these observations raise questions about the importance of TSK in modulating BAT activation in mice, as recently proposed by Wang and colleagues [8].

The underlying reasons for these discrepant findings remain to be fully investigated but it is worth pointing to some key experimental considerations that are likely contributing to the phenotypical discordance between the studies. First, the TSK knockout models used by our respective teams were generated by two independent groups that used embryonic stem cells originating from different mouse strains (129S5/SvEvBrd vs C57BL6 x CBA) [10, 18]. Although both knockout mice were backcrossed to C57BL6J for six generations, differences in the genetic background may have persisted between the models, which could have been sufficient to alter the response to TSK loss. The impact of the genetic background on thermogenesis has been well documented over the years [19, 20]. Further supporting the differences between the two TSK knockout lines, a delay in hair cycle development was found in the TSK knockout mice used by Wang et al. [21], a phenotype that we did not observe in our model (Figure S1). Skin defects were also found in their TSK knockout mouse model [22]. As recently discussed by Nedergaard and Cannon, changes in the quality of skin, fur and hair can reduce insulation and promote heat loss, which is often sufficient to activate the sympathetic nervous system and increase energy expenditure [23]. Taking this into account, it is thus possible that the link between TSK and BAT thermogenesis reported by Wang et al. may have been revealed secondary to a defect in heat conservation. The fact that their TSK knockout mice no longer show elevated BAT activity and protection against obesity when housed at thermoneutrality supports this hypothesis [8]. Lastly, we cannot exclude the possibility that variations in diet composition, housing conditions or gut microbiota composition may have affected the biological outcomes of each study [24].

Although the experimental differences described above could explain part of the discordance between our studies with the TSK null mouse models, they do not explain why TSK overexpression had no impact on BAT activation, body weight regulation and glucose homeostasis. Collectively, the lack of effect of both TSK loss and overexpression on BAT

activation and body weight regulation in our mouse models argue against a significant role of TSK in regulating thermogenesis and energy balance in mice.

## **5. Conclusion**

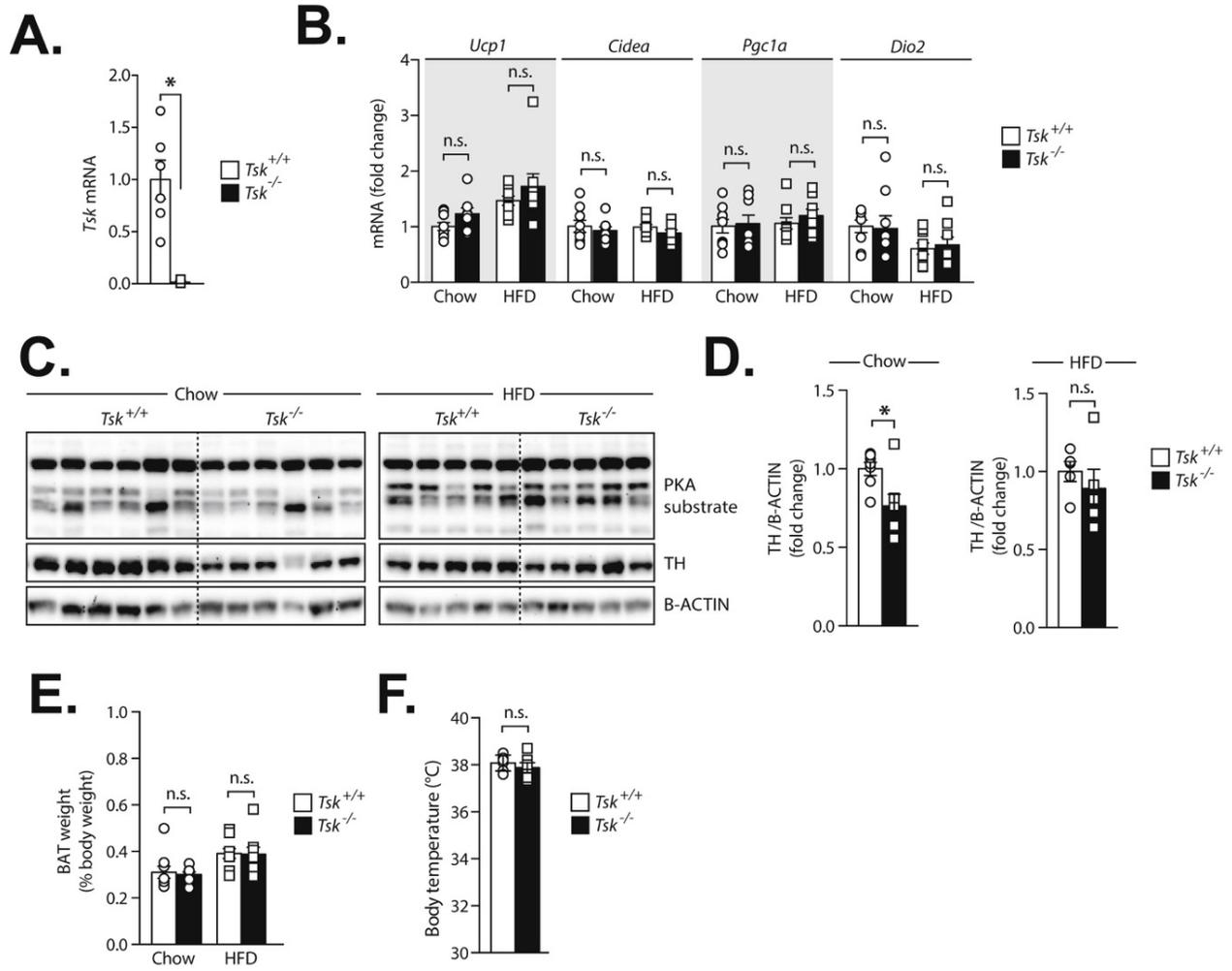
Taken together, our data provide clear evidence that neither the loss nor the overexpression of TSK has any significant impact on BAT thermogenic capacity, body weight gain and glucose homeostasis in mice. We thus feel that the conclusions drawn by Wang et al. should be interpreted with caution until additional studies from independent groups confirm or refute our respective findings.

## **Acknowledgments**

The authors are grateful to Yves Deshaies for advices. This work was supported by grants from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) (271671, 374552 and FDN143247), Les Fonds de recherche du Québec – Santé (FRQS)(24726), Le Réseau de recherche en santé cardiométabolique, diabète et obésité (CMDO), Le Réseau de bio-imagerie du Québec (RBIQ), Diabète Québec, La Fondation de l'Institut universitaire de cardiologie et de pneumologie de Québec – Université Laval (IUCPQ-UL) and Merck Sharpe and Dohme Corp/Faculté de Médecine de l'Université Laval to M.L. Alexandre Caron is a CIHR Banting postdoctoral fellow.

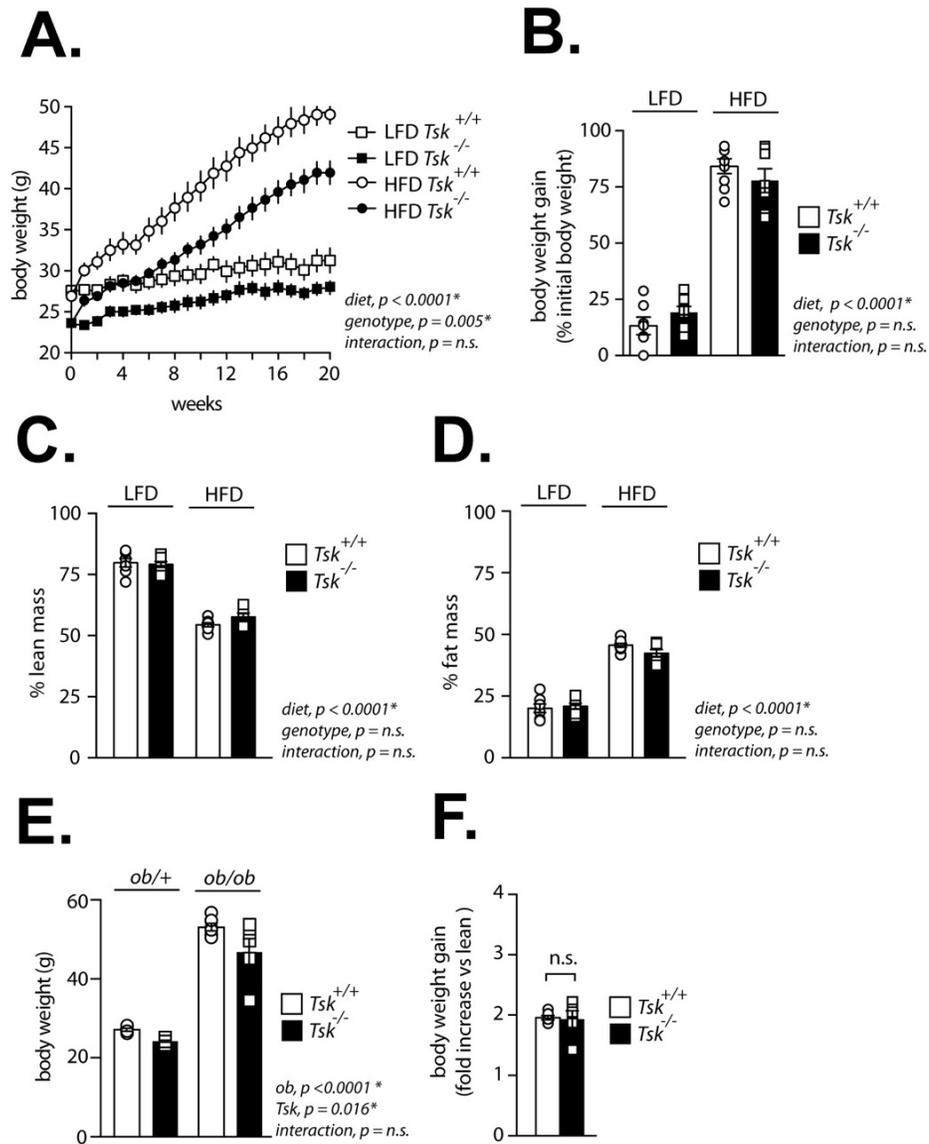
# Figures

## Figure 1.



**Figure 1. Loss of TSK does not affect BAT thermogenic capacity.** **(A)** qPCR analysis of *Tsk* gene expression in the liver of wild-type (*Tsk*<sup>+/+</sup>) and knockout (*Tsk*<sup>-/-</sup>) mice (n=6-7/group). **(B)** qPCR analysis of thermogenic gene expression in BAT of *Tsk*<sup>+/+</sup> and *Tsk*<sup>-/-</sup> mice fed chow or HFD for 12 weeks (n=8-9/group). **(C)** Western blot analyses performed on BAT protein lysates prepared from *Tsk*<sup>+/+</sup> and *Tsk*<sup>-/-</sup> mice fed chow or HFD for 12 weeks. Representative samples are shown. **(D)** Quantification of TH protein levels of samples described in panel C (n=5-7/group). The results are normalized to B-ACTIN. **(E)** BAT weight of *Tsk*<sup>+/+</sup> and *Tsk*<sup>-/-</sup> mice fed either chow or HFD diet for 12 weeks (n=8-9/group). Results are presented as % of body weight. **(F)** Body temperature of *Tsk*<sup>+/+</sup> and *Tsk*<sup>-/-</sup> mice fed chow diet (n=6/group). Data are presented as the mean ± SEM. In panels A, D and F, significance was determined by two-tailed, unpaired *t* test. \**P* < 0.05 versus control. In panels B and E, two-way ANOVA with Sidak's multiple comparisons were performed. \**P* < 0.05 versus wild-type. Non-significant differences (n.s.) are indicated.

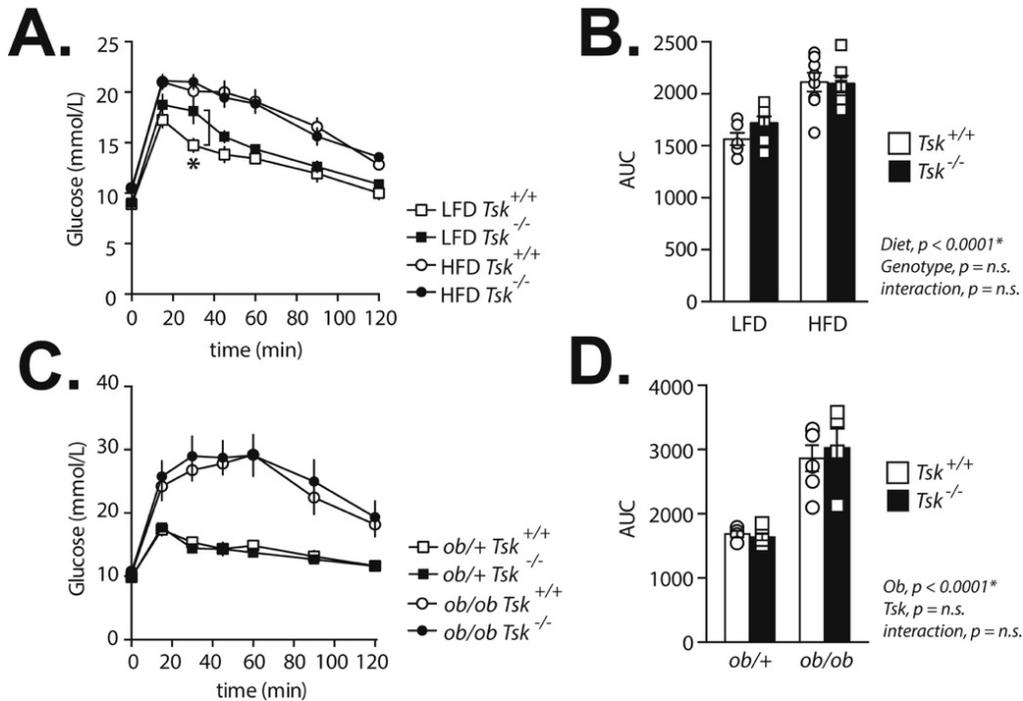
**Figure 2.**



**Figure 2. Loss of TSK does not protect mice against obesity development.**

**(A)** Body weight and **(B)** % of body weight gain of *Tsk*<sup>+/+</sup> and *Tsk*<sup>-/-</sup> mice fed either LFD or HFD diet for 19 weeks (n=6-8/group). **(C)** Percentage of lean and **(D)** fat mass measured by DEXA in mice described in A-B (n=6-8/group). **(E)** Body weight and **(F)** percentage of body weight gain measured in *ob*<sup>+/+</sup> *Tsk*<sup>+/+</sup>, *ob*<sup>+/+</sup> *Tsk*<sup>-/-</sup>, *ob*<sup>ob</sup> *Tsk*<sup>+/+</sup> and *ob*<sup>ob</sup> *Tsk*<sup>-/-</sup> mice (n=6-8/group). Data are presented as the mean  $\pm$  SEM. In panels A to D, two-way ANOVA with Sidak's multiple comparisons were performed. In panel A, body weight at week 20 was used in the analysis. Results from the ANOVA are presented on the side of each panel. In panel F, significance was determined by two-tailed, unpaired *t* test. \**P* < 0.05 versus wild-type. Non-significant differences (n.s.) are indicated.

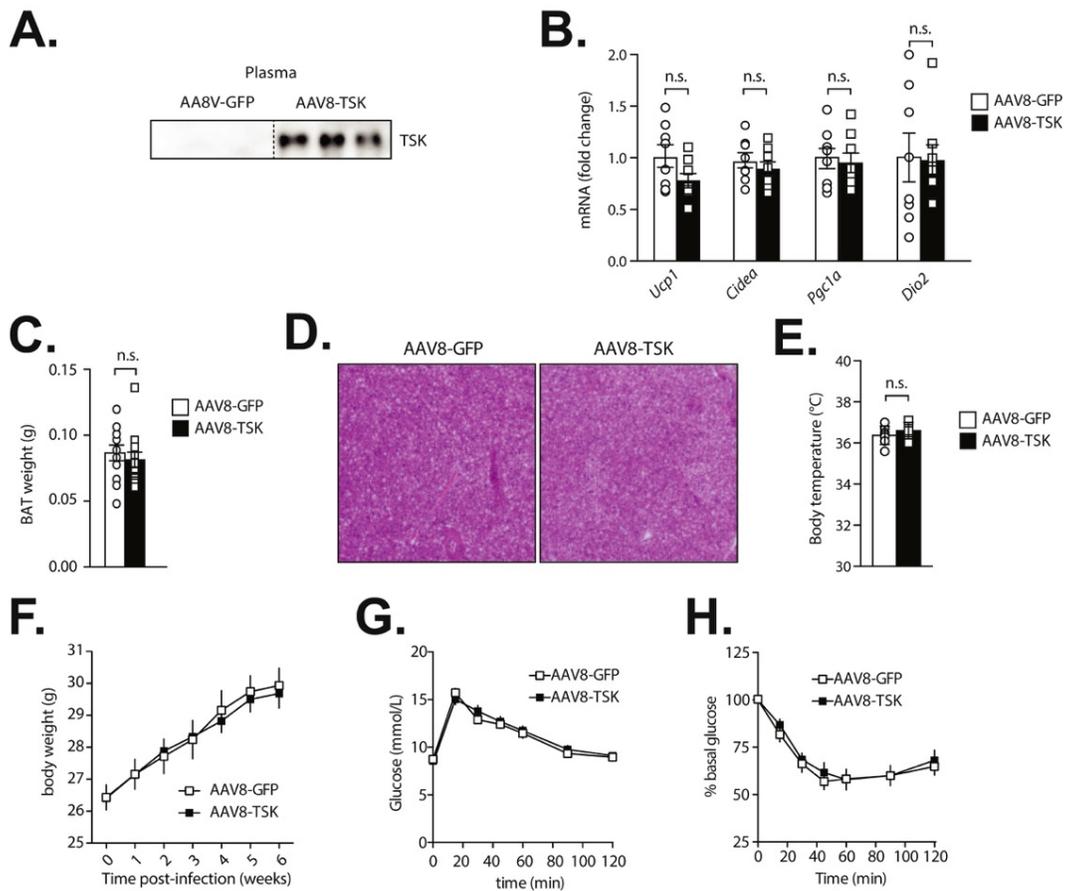
**Figure 3.**



**Figure 3. Loss of TSK does not improve glucose homeostasis.**

**(A)** Glucose tolerance test (GTT) performed in  $Tsk^{+/+}$  and  $Tsk^{-/-}$  mice fed either LFD or HFD (6-8/group). **(B)** Presentation of the area under the curve (AUC) calculated from the experiment described in panel A. **(C)** Glucose tolerance test (GTT) performed in  $ob/+$   $Tsk^{+/+}$ ,  $ob/+$   $Tsk^{-/-}$ ,  $ob/ob$   $Tsk^{+/+}$  and  $ob/ob$   $Tsk^{-/-}$  mice (n=6-8/group). **(D)** Presentation of the area under the curve (AUC) calculated from the experiment described in panel C. Data are presented as the mean  $\pm$  SEM. In panels A to D, two-way ANOVA with Sidak's multiple comparisons were performed. \* $P < 0.05$  versus wild-type. In panel B and D, results from the ANOVA are presented on the side of the graph. Non-significant differences (n.s.) are indicated.

**Figure 4.**



**Figure 4. Overexpression of TSK does not affect BAT thermogenic capacity, body weight and glucose homeostasis.**

**(A)** Western blot analysis of plasma collected from C57BL/6J mice injected with AAV8-GFP or AAV8-TSK. Plasma was collected 4 weeks following AAV8 injection. Representative samples are shown. **(B)** qPCR analyses of thermogenic gene expression in BAT of AAV8-GFP and AAV8-TSK mice sacrificed 4 weeks post injection (n=8/group). **(C)** BAT weight of AAV8-GFP and AAV8-TSK mice (n=12/group). **(D)** Hematoxylin and eosin stained sections of BAT samples collected from AAV8-GFP and AAV8-TSK mice. Representative samples are shown. **(E)** Body temperature of AAV8-GFP and AAV8-TSK mice 4 weeks post injection (n=7-8/group). **(F)** Body weight of AAV8-GFP and AAV8-TSK mice (n=12/group). **(G)** GTT and **(H)** insulin tolerance test (ITT) performed in AAV8-GFP and AAV8-TSK mice (n=12/group). Data are presented as the mean  $\pm$  SEM. In panels B, C and E, significance was determined by two-tailed, unpaired t test. \* $P < 0.05$  versus control. In panels F to H, two-way ANOVA with Sidak's multiple comparisons were performed. \* $P < 0.05$ . Absence of asterisk denotes no significant (n.s.) changes between the groups.

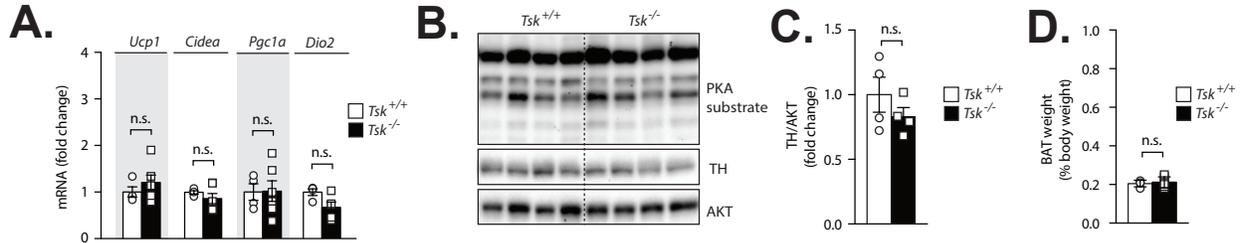
## References

- [1] Després, J.P. and I. Lemieux, Abdominal obesity and metabolic syndrome, *Nature* 444 (7121), 2006, 881-7.
- [2] Tchernof, A. and J.P. Despres, Pathophysiology of human visceral obesity: an update, *Physiol Rev* 93 (1), 2013, 359-404.
- [3] Stefan, N. and H.U. Haring, The role of hepatokines in metabolism, *Nat Rev Endocrinol* 9 (3), 2013, 144-52.
- [4] Meex, R.C.R. and M.J. Watt, Hepatokines: linking nonalcoholic fatty liver disease and insulin resistance, *Nat Rev Endocrinol* 13 (9), 2017, 509-520.
- [5] Watt, M.J., P.M. Miotto, W. De Nardo, and M.K. Montgomery, The liver as an endocrine organ - linking NAFLD and insulin resistance, *Endocr Rev*, 2019.
- [6] Ahmad, S.A.I., M.B. Anam, N. Ito, and K. Ohta, Involvement of Tsukushi in diverse developmental processes, *J Cell Commun Signal* 12 (1), 2018, 205-210.
- [7] Mouchiroud, M., C. Camiré, M. Aldow, A. Caron, E. Jubinville, L. Turcotte, et al., The hepatokine Tsukushi is released in response to NAFLD and impacts on cholesterol homeostasis, *JCI Insight* In press, 2019.
- [8] Wang, Q., V.P. Sharma, H. Shen, Y. Xiao, Q. Zhu, X. Xiong, et al., The hepatokine Tsukushi gates energy expenditure via brown fat sympathetic innervation, *Nature Metabolism* 1 (1), 2019, 252-260.
- [9] Xiong, X., Q. Wang, S. Wang, J. Zhang, T. Liu, L. Guo, et al., Mapping the molecular signatures of diet-induced NASH and its regulation by the hepatokine Tsukushi, *Mol Metab* 20, 2019, 128-137.
- [10] Tang, T., L. Li, J. Tang, Y. Li, W.Y. Lin, F. Martin, et al., A mouse knockout library for secreted and transmembrane proteins, *Nat Biotechnol* 28 (7), 2010, 749-55.
- [11] Laplante, M., H. Sell, K.L. MacNaul, D. Richard, J.P. Berger, and Y. Deshaies, PPAR-gamma Activation Mediates Adipose Depot-Specific Effects on Gene Expression and Lipoprotein Lipase Activity: Mechanisms for Modulation of Postprandial Lipemia and Differential Adipose Accretion, *Diabetes* 52 (2), 2003, 291-9.
- [12] Laplante, M., W.T. Festuccia, G. Soucy, Y. Gelinas, J. Lalonde, and Y. Deshaies, Involvement of adipose tissues in the early hypolipidemic action of PPAR{gamma} agonism in the rat, *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 292 (4), 2007, R1408-17.
- [13] Festuccia, W.T., P.G. Blanchard, V. Turcotte, M. Laplante, M. Sariahmetoglu, D.N. Brindley, et al., The PPARgamma agonist rosiglitazone enhances rat brown adipose tissue lipogenesis from glucose without altering glucose uptake, *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 296 (5), 2009, R1327-35.
- [14] Labbe, S.M., A. Caron, I. Bakan, M. Laplante, A.C. Carpentier, R. Lecomte, et al., In vivo measurement of energy substrate contribution to cold-induced brown adipose tissue thermogenesis, *FASEB J* 29 (5), 2015, 2046-58.
- [15] Caron, A., S.M. Labbe, D. Lanfray, P.G. Blanchard, R. Villot, C. Roy, et al., Mediobasal hypothalamic overexpression of DEPTOR protects against high-fat diet-induced obesity, *Mol Metab* 5 (2), 2016, 102-12.
- [16] Caron, A., S.M. Labbe, M. Mouchiroud, R. Huard, D. Richard, and M. Laplante, DEPTOR in POMC neurons affects liver metabolism but is dispensable for the regulation of energy balance, *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 310 (11), 2016, R1322-31.
- [17] Labbe, S.M., M. Mouchiroud, A. Caron, B. Secco, E. Freinkman, G. Lamoureux, et al., mTORC1 is Required for Brown Adipose Tissue Recruitment and Metabolic Adaptation to Cold, *Sci Rep* 6, 2016, 37223.

- [18] Ito, A., Y. Shinmyo, T. Abe, N. Oshima, H. Tanaka, and K. Ohta, Tsukushi is required for anterior commissure formation in mouse brain, *Biochem Biophys Res Commun* 402 (4), 2010, 813-8.
- [19] Ferrannini, G., M. Namwanje, B. Fang, M. Damle, D. Li, Q. Liu, et al., Genetic backgrounds determine brown remodeling of white fat in rodents, *Mol Metab* 5 (10), 2016, 948-958.
- [20] Hofmann, W.E., X. Liu, C.M. Bearden, M.E. Harper, and L.P. Kozak, Effects of genetic background on thermoregulation and fatty acid-induced uncoupling of mitochondria in UCP1-deficient mice, *J Biol Chem* 276 (15), 2001, 12460-5.
- [21] Niimori, D., R. Kawano, A. Felemban, K. Niimori-Kita, H. Tanaka, H. Ihn, et al., Tsukushi controls the hair cycle by regulating TGF-beta1 signaling, *Dev Biol* 372 (1), 2012, 81-7.
- [22] Niimori, D., R. Kawano, K. Niimori-Kita, H. Ihn, and K. Ohta, Tsukushi is involved in the wound healing by regulating the expression of cytokines and growth factors, *J Cell Commun Signal* 8 (3), 2014, 173-7.
- [23] Nedergaard, J. and B. Cannon, The browning of white adipose tissue: some burning issues, *Cell Metab* 20 (3), 2014, 396-407.
- [24] Ussar, S., N.W. Griffin, O. Bezy, S. Fujisaka, S. Vienberg, S. Softic, et al., Interactions between Gut Microbiota, Host Genetics and Diet Modulate the Predisposition to Obesity and Metabolic Syndrome, *Cell Metab* 22 (3), 2015, 516-530.

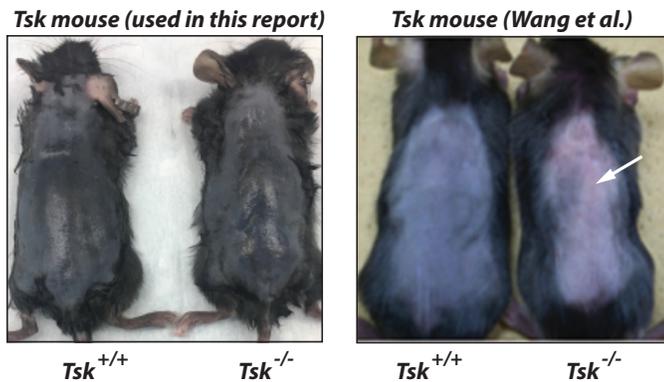
## Supplementary figures

**Figure S1. TSK loss does not affect BAT thermogenic activation in response to a cold challenge.**



**Figure S1. TSK loss does not affect BAT thermogenic activation in response to a cold challenge.** (A) qPCR analysis of thermogenic gene expression in BAT of *Tsk*<sup>+/+</sup> and *Tsk*<sup>-/-</sup> mice exposed to cold (10°C) for 24 hours (n=4-6/group). (B) Western blot analyses performed on BAT protein lysates prepared from *Tsk*<sup>+/+</sup> and *Tsk*<sup>-/-</sup> mice exposed to cold (10°C) for 24 hours (n=4/group). (C) Quantification of TH protein levels of samples described in panel B (n=4/group). The results are normalized to AKT. (D) BAT weight of *Tsk*<sup>+/+</sup> and *Tsk*<sup>-/-</sup> mice exposed to cold (10°C) for 24 hours (n=4-6/group). Results are presented as % of body weight. In panels A, C and D, significance was determined by two-tailed, unpaired *t* test. \**P* < 0.05 versus control. Non-significant differences (n.s.) are indicated.

**Figure S2. The TSK null mouse model used in our study does not show delay in hair follicle development.**



**Figure S2. The TSK null mouse model used in our study does not show delay in hair follicle development.**

(Left panel)  $Tsk^{+/+}$  and  $Tsk^{-/-}$  mice used in this study were sacrificed at 28 days of age and depilated to look at skin pigmentation, an indicator of hair developmental stage. No differences were observed. (Right panel) The  $Tsk$  null mouse used in the report of Wang et al. [8] was previously shown to exhibit defects in hair cycle [21]. In this model, mice show a pink skin at 28 days of age compared to control mice, indicating delayed hair cycle development. The picture presented in the right panel was published by Niimori et al. [21].

## Discussion

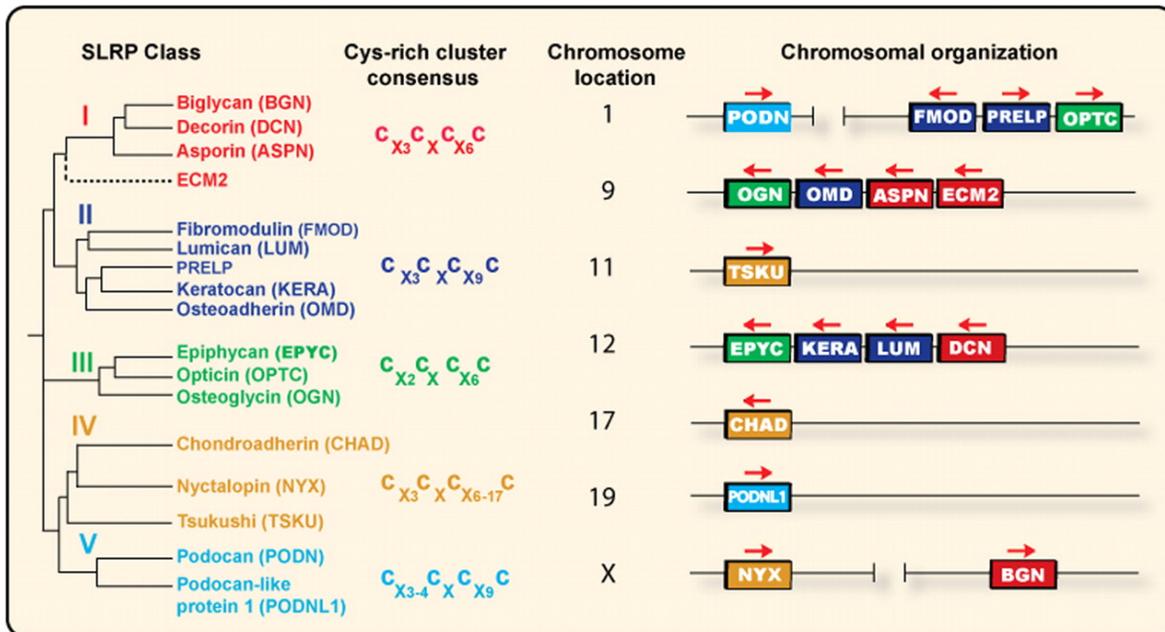
### Discussion générale

La découverte de nouvelles hépatokines impliquées dans la régulation du métabolisme hépatique ou systémique est importante afin de permettre l'amélioration du diagnostic et du traitement des patients souffrants de NAFLD/NASH, mais aussi compléter notre compréhension des mécanismes impliqués dans cette pathologie complexe. Ces dernières années, les connaissances sur les hépatokines et leur rôle dans l'obésité et les pathologies associées ont évolué. Tel que discuté dans l'introduction, le rôle des hépatokines identifiées à ce jour est associé au métabolisme des lipides et du glucose, à la résistance à l'insuline et à l'inflammation. Le foie est un organe sécrétoire important responsable de la libération de très nombreuses protéines dont seulement une partie est identifiée et caractérisée. Il existe encore un certain nombre de protéines sécrétées par le foie encore non identifiées qui possèdent un potentiel rôle dans l'obésité et les pathologies associées, et qui pourraient permettre d'améliorer la compréhension des mécanismes liant les différentes comorbidités de l'obésité ainsi que d'améliorer le diagnostic et le traitement de la NAFLD. Les travaux de recherche effectués dans le cadre de cette thèse avaient pour but d'identifier de nouvelles hépatokines impliquées dans la régulation du métabolisme hépatique et/ou systémique en contexte d'obésité. Ces travaux ont été réalisés afin de caractériser une hépatokine sélectionnée, d'identifier les mécanismes impliqués dans sa régulation et d'identifier l'impact de sa perte ou de sa surexpression sur le métabolisme hépatique/systémique chez la souris.

### Identification de TSK, une protéine de la famille des SLRPs.

Dans le chapitre 1, nous identifions TSK comme une nouvelle hépatokine exprimée et sécrétée en réponse à la stéatose hépatique indépendamment de l'obésité. TSK appartient à la famille des SLRPs (*Small Leucine Rich Proteoglycan*), une famille de protéine composée principalement de protéines extracellulaires capables de moduler certaines voies de signalisation. Les protéines de cette famille sont au nombre de 17 et sont réparties en cinq classes selon la conservation à travers l'évolution, la présence caractéristique de séquences riches en cystéine en position N-terminal et l'organisation chromosomale (Figure 13) (469). Les classes I, II et III possèdent des critères classiques de cette famille de protéine alors que les classe IV et V s'en éloignent. TSK appartient à la classe IV des SLRPs qui comprend également Chondroadherin (CHAD) et Nyctalopin

(NYX). Ces trois protéines sont peu connues de la littérature. Toutes les SLRPs subissent des modifications post-traductionnelles sous la forme de chaînes de glycosaminoglycane (GAG). Les SLRPs sont souvent localisées à plusieurs sur un même chromosome, sauf certaines d'entre elles comme TSK. Il est possible que la duplication de chromosomes au cours de l'évolution soit responsable de cette organisation particulière et potentiellement de la redondance de certaines fonctions (469).



**Figure 13: Analyse phylogénétique et organisation chromosomique des classes de SLRP chez l'humains. Adapté de(469)**

Les SLRPs ont de nombreuses fonctions qui varient selon leur localisation et leur liaison à d'autres protéines. Cette famille de protéine a été associée à l'organisation de la matrice extracellulaire (MEC) dans laquelle elles sont souvent incorporées. La première fonction reconnue des SLRPs est leur capacité à interagir avec les fibres de collagène et de réguler leur assemblage et leur taille. Les SLRPs se lient aux molécules de collagène au niveau de leurs motifs de répétition riche en leucine limitant le diamètre des fibres de collagène mature. De plus, les SLRPs sont capables d'interagir avec de nombreux récepteurs de surface, des cytokines, des chimiokines, des facteurs de croissance et d'autres composants de la MEC (470). La liaison directe de ces diverses molécules au noyau riche en leucine ou aux chaînes de GAG des SLRPs contrôle leur biodisponibilité et leur activité. En effet, elles peuvent être séquestrées dans la MEC créant un gradient ou un

réservoir biologique proche des récepteurs cellulaires. Cela permet de les présenter à leur récepteur respectif permettant d'augmenter l'aptitude signalétique, ou au contraire de les tenir loin des récepteurs prévenant ainsi l'interaction ligand-récepteur et diminuant la signalisation. Ces différentes interactions ont des effets directs sur les voies de signalisation cellulaires régulant la prolifération, la migration et le système immunitaire (471,472). Parmi les SLRPs, plusieurs ont été associées à des pathologies incluant la fibrose rénale, le cancer et l'ostéoporose. Lorsque les SLRPs n'interagissent pas avec des fibres de collagène, elles peuvent avoir des fonctions différentes sous leur forme soluble (473).

Decorin (*Dcn*) et Biglycan (*Bgn*), deux membres de la famille des SLRPs, sont associées à la fibrose rénale et au cancer avec des fonctions dans la fibrose et l'inflammation, et laissent penser qu'elles pourraient être transposées à la fibrose et à l'inflammation hépatique présentes dans les stades avancés de stéatose hépatique. *Dcn* a des fonctions anti-fibrotiques et *Bgn* joue un rôle dans l'inflammation. *Dcn* est exprimé par les fibroblastes et présent majoritairement dans l'espace périrubulaire d'un rein en santé. Cependant, en contexte de fibrose rénale DCN s'accumule au niveau des zones de fibrose tubulointerstitiales. Il est supposé que DCN est séquestré dans la MEC empêchant son interaction avec des récepteurs cellulaires. La forme soluble de DCN peut se lier aux récepteurs TGF $\beta$ R et IGFR (insulin-like growth factor receptor) entraînant une compétition avec TGF $\beta$  et une inhibition de l'apoptose. De cette façon, l'action de TGF $\beta$  est réduite avec le processus de fibrose augmentant ainsi la survie des cellules rénales (474). De plus, des études en contexte de cancer ont également montré la fonction inhibitrice de *Dcn* sur TGF $\beta$ . Une interaction entre DCN et TLR2/TLR4 est responsable d'un milieu pro-inflammatoire et de la restriction de la croissance de la tumeur (475). D'autre part, *Bgn* est exprimé dans la majorité des tissus et est un composant de la MEC en condition normale. Des études ont mis en évidence que dans un contexte pathologique BGN agit comme une DAMPs, un signal de danger, résultant en l'initiation de l'inflammation dans le rein. La forme soluble de BGN, issue de la libération de la protéine séquestrée dans la MEC ou sécrétée par les macrophages, est un ligand de TLR2 et de TLR4. Cette interaction induit l'activation des macrophages avec la production de cytokines pro-inflammatoires et le recrutement de nouveaux macrophages qui sécrètent eux aussi BGN (476). D'autres études ont démontré que l'interaction de BGN avec TLR2/TLR4 des cellules immunitaires innées induit l'inflammation via la voie NF- $\kappa$ B facilitant la migration des cellules cancéreuses (475). Au-delà de cet exemple, les SLRPs peuvent affecter d'autres voies de signalisation, souvent similaires, reflétant une certaine redondance dans leurs fonctions. Cet exemple intéressant

de fibrose et d'inflammation en condition de fibrose rénale pourrait être transposé à la fibrose hépatique en contexte de NASH.

Dans les dernières années, plusieurs SLRPs ont été associés à l'obésité et aux pathologies hépatiques incluant *Dcn*, *Bgn*, *Lumican (Lum)* et *Fibromodulin (Fmod)*. En contexte d'obésité, l'expression de *Dcn* et *Bgn* est augmentée dans le tissu adipeux. Des études *in vitro* indiquent que *Bgn* et *Dcn* réduisent la prolifération des préadipocytes par l'induction de l'apoptose (477). Ces fonctions sont dues à leurs chaînes de GAGs. Chez les souris *Bgn*-KO soumises à une diète riche en gras, l'expression de certains marqueurs dans le tissu adipeux incluant IL-6 et CD68 est plus faible que chez les souris sauvages. De plus, les souris *Bgn*-KO nourries avec une diète riche en gras possèdent des niveaux d'adiponectine plus élevés. D'autres études ont montré que l'expression de *Bgn* et *Dcn* est augmentée par la fibrose hépatique induite par la ligature du conduit biliaire ou par l'administration de thioacétamide, un agent chimique utilisé pour induire la fibrose (478). De plus, l'expression de *Dcn* est augmentée par la fibrose causée par des injections de tétrachlorure de carbone (CCl<sub>4</sub>). Dans ces différentes conditions, la modulation de l'expression de *Bgn* et *Dcn* est associée aux sites de fibrose. Chez les souris *Dcn*-KO, le développement de la fibrose hépatique est plus important et la cicatrisation plus faible que chez les souris sauvages (WT) (479). D'autre part, des études ont démontré que *Fmod* est augmenté dans la fibrose hépatique chez plusieurs modèles murins ainsi que chez des individus atteints d'une cirrhose induite par l'hépatite C (480). Les souris *Fmod*-KO possèdent une plus faible fibrose que les souris WT. D'autre part, chez les individus obèses atteints de NASH, les niveaux de *Lum* sont plus élevés en fonction du degré de stéatose. En effet, *Lum* n'est pas augmenté chez les individus atteints d'une stéatose simple, il est augmenté en contexte de NASH modéré et d'avantage chez les individus ayant une NASH sévère (481). *In vivo*, des études ont mis en évidence que la perte de *Lum* est responsable de la diminution de la stéatose hépatique (482). Les études réalisées montrent une régulation positive de ces SLRPs en contexte de pathologie hépatique et notamment de la fibrose hépatique mais ne précisent pas leurs rôles spécifiques. À l'exception de *Dcn* qui est associé à un rôle de protection contre le développement de la fibrose, *Bgn*, *Lum* et *Fmod* en favorise le développement. *Lum* et *Dcn* sont les seules SLRPs à avoir été étudiées en contexte de NAFLD/NASH en contexte d'obésité avec une association à la phase fibrotique qui apparaît dans un stade tardif de la pathologie. Les études menées mettent en évidence une régulation de *Dcn*, *Bgn*, *Lum* et *Fmod* par TGFβ1 et par l'inflammation qui pourrait expliquer la modulation de leur expression à des phases plutôt tardives de la pathologie.

TSK est une SLRPs dont l'induction d'expression et de sécrétion est rapide lors de l'apparition des dommages hépatiques. Nos études montrent que TSK est régulé par le stress du RE, l'accumulation de lipides et l'inflammation indiquant un lien potentiel à un stade plus précoce de la pathologie.

TSK est peu connue de la littérature. Les publications existantes à son sujet décrivent TSK comme un modulateur extracellulaire de plusieurs voies de signalisation. Plusieurs articles lui donnent un rôle dans le développement embryonnaire en agissant sur plusieurs voies de signalisation incluant BMP (*bone morphogenetic protein*), FGF (*fibroblast growth factor*), Nodal et Notch. Dans les premières études réalisées dans des embryons de poulet, *Tsk* a été décrit comme un antagoniste de BMP4 en agissant avec chordin (483). Chez *Xenopus*, la présence de BMP4 est requise pour l'expression de *Tsk* qui inhibe BMP4 et modifie l'activation de la voie Notch (484). Par la suite, une étude a montré que *Tsk* inhibe BMP4 et FGF8 et active *Xnr2* (*Xenopus nodal-related gene*), un élément de la voie de signalisation Nodal, favorisant la formation de l'endoderme (485). Des études ont également été réalisées chez l'adulte dans différentes espèces. Chez le poulet, une étude a montré que *Tsk* interagit avec *Frizzled4* bloquant l'activation de *Wnt2b* et de ce fait inhibant la voie de signalisation Wnt (486). D'autre part, il a été observé que l'activation de SXR (*steroid and xenobiotic sensing nuclear receptor*) par la vitamine K2 induit l'expression de marqueurs ostéoblastiques favorisant l'accumulation de collagène dans les ostéoblastes. Dans ces conditions, l'expression de *Tsk* est induite et rappelle des fonctions similaires de *Bgn* dans les os (487). Des publications ont également décrit une augmentation de l'expression de *Tsk* en réponse à un agoniste de *Ppar $\alpha$*  chez l'Homme (488), à l'insuline (489) et à des médicaments induisant des injures hépatiques chez le rat (490). Les observations de la dernière étude sont intéressantes et pourraient être transposées aux dommages hépatiques lors de la stéatose. De plus, certaines études ont montré un rôle de *Tsk* dans la régulation de TGF- $\beta$ 1 (491) et de l'inflammation (473). L'interaction directe de TSK avec TGF- $\beta$ 1 est une étape essentielle pour la croissance des poils qui est retardée chez les souris *Tsk-KO* (491). Dans cette étude, une augmentation de l'expression de *Tgfb1* et *Il-6* a été observée chez les souris *Tsk-KO* lors de la guérison de lésions induites (473). Les fonctions de TSK dans le métabolisme restent cependant inconnues.

### **TSK est modulée par la stéatose hépatique.**

TSK est exprimée et sécrétée majoritairement dans le foie. Nous avons mis en évidence que TSK est induite dans divers modèles murins d'obésité et de stéatose

hépatique. Nous avons essayé différents anticorps commerciaux pour détecter TSK par immunobuvardage mais ces derniers se sont montrés non spécifiques et incapables de détecter la bande d'intérêt au poids moléculaire attendu. Nous avons donc décidé de générer un anticorps sur mesure pour détecter TSK par immunobuvardage *in vitro* et *in vivo*. Nous avons mis en évidence une corrélation entre l'accumulation de triglycérides hépatiques et l'expression de *Tsk*. En revanche, lorsque nous avons induit l'accumulation de lipides *in vitro* en utilisant l'oléate, un AG qui induit peu de lipotoxicité et de stress du RE, aucune modulation de l'expression de *Tsk* n'a été observée (données non montrées). Ces résultats indiquent que la présence d'AG seule ne suffit pas à induire l'expression de *Tsk*. Dans la stéatose hépatique, l'accumulation de lipides est associée au stress du RE et à l'inflammation. Nous avons mis en évidence que le stress du RE, qui active la réponse UPR, induit l'expression de *Tsk in vivo* et *in vitro*. Dans des études *in vitro*, nous avons montré que les voies IRE1 $\alpha$  et PERK de la réponse UPR sont toutes deux impliquées dans la régulation de *Tsk*. Ces résultats suggèrent que la réponse UPR globale est responsable de la régulation de *Tsk*. Dans notre étude *in vivo*, l'injection de tunicamycine chez la souris induit l'expression de *Tsk* mais pas sa sécrétion. La tunicamycine est un agent chimique qui inhibe la N-glycosylation des protéines bloquant leur sécrétion. Le fait que TSK ne soit pas détectée dans le plasma des souris injectées avec de la tunicamycine suggère une sécrétion de TSK par la voie classique de sécrétion. Nous ne pouvons pas exclure un manque de sensibilité de notre anticorps en immunobuvardage. Dans d'autres études, nous avons montré que l'inflammation induit l'expression de *Tsk*. *In vitro*, les cellules traitées avec un mélange de cytokines ont une expression augmentée de *Tsk* alors que les cytokines individuelles ne sont pas suffisantes pour induire l'expression de *Tsk*. *In vivo*, l'injection de LPS chez la souris induit l'expression de *Tsk*. De plus, l'injection de CCl<sub>4</sub> chez la souris est responsable d'une forte induction et sécrétion de TSK. Nous avons également réalisé une étude de réversibilité de stéatose utilisant une diète MCD (*methionine deficient diet*) puis un retour à une diète normale. Dans ce modèle nous montrons une diminution de l'expression et de la sécrétion de TSK avec la résolution de la stéatose incluant la diminution de la quantité de triglycérides hépatiques, du stress du RE et de l'inflammation. Ces résultats indiquent une régulation de *Tsk* par l'accumulation de lipides, le stress du RE et l'inflammation, trois éléments fortement liés en condition de NAFLD/NASH.

Nous avons observé que le degré de modulation de l'expression et de la sécrétion de *Tsk* n'est pas la même dans tous les modèles. L'expression et la sécrétion de *Tsk* sont plus fortement augmentées dans les modèles d'obésité sévère incluant les souris *ob/ob* et

*db/db*. Nous avons également observé une forte induction de *Tsk* en condition de dommages hépatiques sévères incluant les souris injectées avec du CCl<sub>4</sub>. Les différences d'expression et de sécrétion peuvent être expliquées par les divergences des modèles en termes de poids des animaux mais aussi en fonction des altérations hépatiques induites par les traitements. Les modèles d'obésité utilisés incluent des modèles génétiques tels que les souris *ob/ob* et *db/db*, qui sont des animaux obèses depuis leur naissance avec une altération de la signalisation de la leptine. Ces modèles ne développent pas de NASH et de fibrose mais possèdent des hauts niveaux de TG hépatiques. L'autre modèle d'obésité utilisé est induit avec une diète riche en gras. Dans ce contexte, l'obésité est induite progressivement et présente une forme plus avancée de stéatose hépatique. Le modèle MCD quant à lui n'induit pas d'obésité mais une perte de poids. Cependant, ce modèle induit une forme avancée de stéatose hépatique. Les injections de CCl<sub>4</sub> *in vivo* chez la souris induisent d'importants dommages hépatiques incluant l'accumulation de lipides, le stress du RE et une forte inflammation. Il semble que les effets de l'accumulation de lipides, du stress du RE et de l'inflammation soit additifs et augmentent d'autant plus l'induction de l'expression et de la sécrétion de TSK. De plus, la sécrétion de TSK n'est pas modulée de la même façon que son expression génique. En effet, la sécrétion de la protéine est nettement supérieure à l'induction de l'expression d'ARNm indiquant la présence de mécanismes de régulation de la sécrétion/libération de TSK et de son renouvellement. TSK appartient à la famille des SLRPS, des protéines connues pour interagir avec la MEC. Certaines d'entre elles ont été suggérées pour agir comme des DAMPs, des molécules gardées dans les cellules ou séquestrées dans l'ECM et libérées lors d'injures, de stress ou de mort cellulaires. Ces molécules jouent un rôle dans l'inflammation et l'activation de voies signalétiques spécifiques selon la nature des DAMPs mis en jeu (300). C'est le cas de BGN qui est relâchée de la MEC en réponse au stress ou aux injures pour activer la réponse immunitaire (492–497). Ici, TSK semble être relarguée fortement et rapidement en réponse aux stress et dommages hépatiques, suggérant une action similaire aux DAMPs.

### **TSK chez l'humain.**

Chez la souris, nous avons observé une induction de l'expression et de la sécrétion de TSK en réponse à la NAFLD. Afin de déterminer si TSK est modulée chez l'humain, nous avons mesuré son expression dans le foie d'une cohorte de patients obèses. Nous avons montré que l'expression de *TSK* est plus importante chez les patients ayant une plus grande quantité de TG hépatiques. Ces résultats confirment l'association entre l'expression de *TSK*

et la NAFLD, pas seulement chez la souris mais aussi chez l'humain. Nous avons également observé une association entre l'expression de *TSK* et des marqueurs de l'inflammation, indiquant un potentiel rôle de l'inflammation dans l'induction de *TSK* chez l'humain. En revanche, nous n'avons pas été en mesure de détecter la protéine dans le plasma de ces patients. Nous n'avons pas non plus détecté *TSK* dans le plasma de souris obèses nourries avec une diète riche en gras. Comme mentionné précédemment, il est possible que la quantité de *TSK* soit inférieure au seuil de détection de *TSK* par immunobuvardage. Nous ne pouvons pas exclure une différence dans les modifications post-traductionnelles ou la formation de multimères qui pourraient masquer les épitopes de l'anticorps. D'autre part, nos échantillons proviennent d'individus qui sont obèses depuis de nombreuses années. L'apparition de l'obésité chez l'Homme prend plusieurs années tandis que chez la souris, l'obésité est induite plus rapidement. Nous ne connaissons pas le comportement de *TSK* au court du temps dans ce genre de conditions métaboliques chez l'humain. Il est donc possible que la protéine soit sécrétée dans les premiers temps de l'obésité puis que ces niveaux diminuent au cours des années. De plus, la plupart des patients obèses prennent des traitements pour les comorbidités associées à l'obésité qui pourraient affecter les niveaux de *TSK*.

Afin de valider la sécrétion de *TSK* dans des conditions d'inflammation et de stress du RE sévères, nous avons mesuré la protéine dans le plasma d'individus admis aux urgences pour une défaillance hépatique aigue causée par l'acétaminophène, une condition connue pour induire de l'inflammation, l'activation de la réponse UPR et une fonction du RE altérée (498–501). Dans ce contexte, nous avons détecté une forte quantité de *TSK* chez certains patients dans le prélèvement du jour d'admission. Nous avons noté que *TSK* n'est plus détecté lors du deuxième prélèvement effectué quelques jours plus tard. Encore une fois, il est probable que la quantité de *TSK* à ce moment soit en dessous du seuil de détection. Lors de ces analyses nous avons observé que les niveaux de *TSK* étaient significativement plus élevés chez les patients décédés ou ayant reçu une greffe du foie par rapport aux survivants. Ainsi, une quantité élevée de *TSK* en circulation est associée à une diminution de la survie sans transplantation. Ces résultats indiquent que *TSK* est une hépatokine circulant à de hauts niveaux en réponse aux dommages hépatiques sévères à la fois chez la souris et chez l'humain. *TSK* pourrait servir de biomarqueur pour déterminer la nécessité de transplanter les patients admis aux urgences pour une défaillance hépatique aigue. Une étude sur une plus grande cohorte devra être faite pour valider ces observations

et peut-être identifier des déterminants chez les patients présentant une forte quantité de TSK dans leur sang.

### **Un phénotype mineur dans le modèle TSK-KO.**

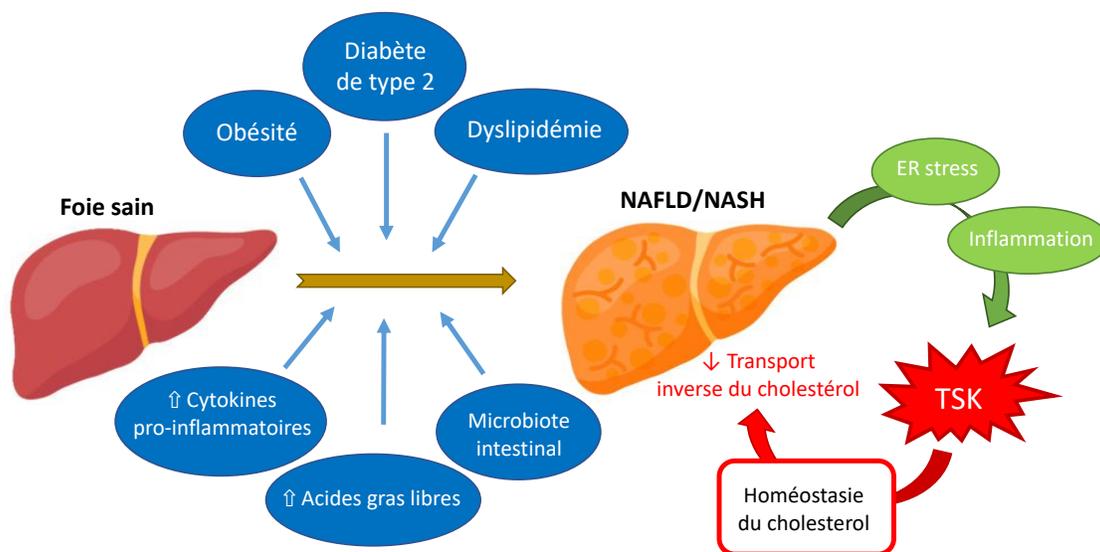
Afin d'étudier le rôle de TSK dans le métabolisme nous avons utilisé un modèle murin déficient en *Tsk* (TSK-KO). Nous avons observé l'impact de la perte de TSK en condition basale, d'obésité et/ou de dommages hépatiques. Dans le modèle TSK-KO utilisé, nous avons observé un phénotype mineur dans les différents protocoles réalisés. Nous concluons que TSK n'a pas d'impact sur le développement et la sévérité de la NAFLD mais a un impact sur le métabolisme du cholestérol. Le modèle utilisé est un KO complet. Ainsi, l'absence d'un phénotype plus marqué peut être expliqué par la mise en place de mécanismes d'adaptations au cours du développement. En effet, TSK appartient à la famille des SLRPs, une famille de protéines pour laquelle de précédentes études ont montré de potentiels mécanismes de compensation (502). Il est donc possible qu'une ou des protéine(s) de la famille des SLRPs compense(nt) la perte de TSK. Par exemple, les KO indépendants de *Dcn* ou *Bgn*, des SLRPs appartenant à la classe II, présentent des effets modérés (503–506). En revanche, le double KO de *Dcn* et *Bgn* montre un phénotype osseux qui apparaît plus tôt et qui est plus sévère. Il y a un effet synergique du double KO malgré l'absence d'effet sur les os dans les souris *Dcn*-KO (505,507). Une autre étude montre aussi un effet synergique du double KO de *Bgn* et *Lum*, appartenant aux classes I et II respectivement, comparé au KO simple (504,507). La délétion d'une SLRP tôt dans le développement semble être responsable de la mise en place de mécanismes de sauvetage/compensation. Ces mécanismes résultent souvent en l'augmentation de l'expression d'une autre SLRP ayant une fonction similaire voir identique. Ces observations confirment la redondance existante au sein de la famille des SLRPs. Une autre publication montre une action similaire de *Fmod* et *Lum*, appartenant à la classe II des SLRPs, mais à des instants différents (502,504,508,509). Les souris *Lum*-KO montre une altération des fibres de collagène tôt dans le développement qui disparaît progressivement. En revanche, chez les souris *Fmod*-KO des effets sont observés tôt et deviennent plus sévères dans le temps. Le double KO de *Fmod* et *Lum* montre des effets sévères tôt dans le développement qui deviennent similaires au simple KO de *Fm* au cours du temps. Ces deux SLRPs agissent à différents stades du développement/maturation (510,511). Ainsi, il est possible que la délétion complète de *Tsk* dans notre modèle soit responsable d'un mécanisme de compensation durant l'embryogenèse et le développement expliquant le phénotype mineur observé à l'âge

adulte. Nous avons mesuré l'expression des différentes SLRPs dans notre modèle *Tsk*-KO et n'avons pas observé de différence d'expression par rapport aux souris sauvages. Malgré cette absence de différence, il n'est pas exclu que d'autres mécanismes de compensation interviennent dans ce modèle.

### **TSK : un rôle dans l'homéostasie du cholestérol.**

Chez l'Homme, la NAFLD est fortement associée à la résistance à l'insuline et à l'athérosclérose mais également aux événements cardiovasculaires. Des altérations du profil des lipoprotéines sont observées chez les patients atteints de NAFLD incluant une augmentation des LDL petites et denses, une réduction de la quantité d'HDL et d'ApoA1 et une augmentation des TG. Chez ces patients, une réduction de la capacité de l'efflux de cholestérol est également observée et est proposé comme le mécanisme liant la NAFLD aux maladies cardiovasculaires. Cependant, le lien entre la NAFLD et la modulation des niveaux d'HDL et du transport inverse de cholestérol n'est pas connu. Dans le chapitre 1, nous montrons que la surexpression de TSK chez la souris induit une réduction du cholestérol plasmatique total et plus particulièrement de la fraction de cholestérol HDL. L'effet inverse, c'est-à-dire une augmentation du cholestérol plasmatique, est observé chez les souris TSK-KO. Ce changement des niveaux de HDL est accompagnée par une modulation d'ApoA1, l'apolipoprotéine majeure des particules HDL. Plus précisément, les niveaux d'ApoA1 sont diminués dans le modèle de surexpression et augmentés chez les souris TSK-KO. En lien avec ces résultats, des études *in vitro* et *in vivo* mettent en évidence que la modulation des niveaux d'HDL a un impact sur l'efflux de cholestérol. Les données montrent une diminution du transport inverse du cholestérol dans le modèle de surexpression et une augmentation chez les souris *Tsk*-KO. Chez les souris surexprimant *Tsk* de manière aigüe, nous avons observé une réduction de l'expression dans le foie de plusieurs gènes incluant *Srb1* (*scavenger receptor B1*) et *Ldlr*, des gènes impliqués dans l'assimilation du cholestérol HDL et LDL, respectivement. TSK est également responsable de la réduction de l'expression de *Srebf1* (*sterol regulatory-element binding transcription factor 1*) et *Srebf2*, et certaines de leurs cibles. Les résultats indiquent que la surexpression de TSK affecte différents éléments pour diminuer l'apport de cholestérol au foie. De plus, TSK réduit l'expression de *Cyp7a1* (*cytochrome P450 family 7 subfamily A member 1*) et *Cyp8b1* (*cytochrome P450 family 8 subfamily B member 1*), deux enzymes limitantes régulant la synthèse d'acides biliaires dans les hépatocytes. En lien avec ces données, il y a une réduction de plusieurs espèces d'acides biliaires dans le foie et le plasma des souris

surexprimant TSK de façon chronique. De plus, les souris *Tsk* surexpresser montrent une réduction des niveaux circulants de 7 $\alpha$ C4 (7- $\alpha$ -hydroxy-4-cholesten-3-one), un marqueur de la synthèse des acides biliaires. Nous montrons que TSK, sécrétée en réponse à la NAFLD, agit sur les niveaux de cholestérol HDL circulant, l'efflux de cholestérol et la conversion du cholestérol en acides biliaires dans le foie chez la souris. D'autre part, des études montrent que l'inflammation altère le transport du cholestérol inverse et la production des acides biliaires chez la souris et chez l'Homme. TSK pourrait faire partie d'un processus limitant le transport du cholestérol inverse lorsque les hépatocytes sont en conditions de stress. Bien que l'effet initial de TSK puisse être bénéfique, une action soutenue dans l'obésité et la NAFLD pourrait contribuer à l'athérosclérose en limitant le transport inverse du cholestérol (Figure 14).



**Figure 14: Schéma bilan de l'étude : « Tsukushi : une nouvelle hépatokine surproduite en réponse à la NAFLD ».**

Ces modulations suggèrent que TSK est un biomarqueur potentiel du stress hépatique associant la NAFLD à la dyslipidémie athérogène et à l'athérosclérose. TSK appartient à la famille des SLRPs dont certaines d'entre elles incluant *Bgn* et *Dcn* sont associées à l'athérosclérose. *Bgn* et *Dcn* sont présentes dans l'espace extracellulaire des parois artérielles et ont la capacité de se lier aux fibres de collagène de type I et III, et de

modifier la fibrillogenèse du collagène et le paquetage des fibrilles (470). Des études ont montré que *Dcn* est augmenté dans les lésions d'athérosclérose et possède des fonctions dans la rétention des lipides et la calcification. Sa fonction varie selon l'environnement inflammatoire, le type cellulaire et le stade pathologique. Chez les souris *Dcn*-KO, la formation de fibre de collagène est perturbée engendrant des problèmes mécaniques au niveau de la peau et l'épaisseur des fibres. Comme *Dcn*, *Bgn* joue un rôle dans la rétention des lipides. Des études ont mis en évidence la colocalisation de *Bgn* avec l'ApoB chez des modèles d'athérosclérose murins et humains. De plus, les particules LDL oxydées induisent une augmentation de l'expression de *Bgn* (512). Les souris surexprimant *Bgn* montrent une augmentation de la rétention des lipides et des lésions d'athérosclérose. La quantité vasculaire de *Bgn* est associée à la sévérité des lésions d'athérosclérose. Cependant, les souris *Bgn*-KO ne présentent pas d'effet antiathérogène (512). De plus, des études montrent que la roxustatine, utilisée pour améliorer le taux de cholestérol total, induit l'augmentation de *Dcn* et *Bgn*. Cependant, l'effet de la roxustatine n'est pas direct. La roxustatine mène à l'augmentation de la quantité de collagène dans la matrice, et c'est cette dernière qui induit l'expression de *Dcn* et *Bgn*. En effet, *Dcn* et *Bgn* augmentent en association avec le dépôt et la densité de collagène. Des changements similaires sont observés dans l'athérosclérose chez l'Homme après le traitement avec des statines. Il est possible que l'augmentation de *Bgn* et *Dcn* suite au traitement avec de la roxustatine stabilise et compacte la matrice de collagène. Cependant, l'augmentation de *Bgn* et *Dcn* n'est pas responsable d'une plus grande rétention des LDL qui pourrait être expliquée par l'action de la roxustatine sur la capacité de liaison des LDL aux GAGs (513). Ces données indiquent que les SLRPs jouent des rôles dans l'athérosclérose et laissent penser que TSK pourrait ainsi avoir une action dans cette pathologie et faire le lien entre la modulation des HDL et le transport inverse de cholestérol. D'autre part, la modulation de gènes dans le foie indique une action autocrine et/ou paracrine de TSK. Dans la littérature, TSK est décrite comme une protéine extracellulaire qui peut agir localement et activer des voies de signalisation incluant Wnt, TGF $\beta$ , BMP, et FGF (484–486,491). Cependant, nous n'avons pas observé d'effets de TSK sur les niveaux de phosphorylation d'effecteurs de ces voies dans nos études (données non montrées). Toutefois, d'autres voies de signalisation peuvent être impliquées. Il est également possible que TSK se lie à un récepteur membranaire encore non identifié ou interagisse avec des protéines du plasma en modulant leurs fonctions. Nous montrons que TSK est un biomarqueur potentiel du stress hépatique associant la NAFLD à la dyslipidémie athérogène et à l'athérosclérose.

### Articles récemment publiés sur TSK.

Dernièrement, deux articles portant sur TSK ont été publiés. Le premier article de Xiong *et al.* montrent l'induction de l'expression de TSK dans le foie et de sa sécrétion dans le plasma en réponse à la stéatose hépatique dans différents modèles incluant l'obésité. Des observations qui viennent confirmer nos résultats. Les auteurs de l'article décrivent TSK comme une hépatokine ayant une contribution dans le développement de l'obésité et de la résistance à l'insuline en réponse à une diète riche en gras. De plus, l'induction de la NASH par une diète spécifique est responsable d'une augmentation de l'expression et de la sécrétion de TSK. Les résultats montrent une sécrétion de la protéine plus importante que l'induction de l'expression. Une observation faite dans nos études qui souligne la présence de mécanismes de régulation de la sécrétion de TSK et de son renouvellement. Le groupe a étudié la NASH chez des souris *db/db* et/ou induite par la diète MCD. Les souris sauvages (WT) nourries avec la diète MCD présentent des niveaux augmentés de TSK en circulation. Les souris *db/db* nourries avec la diète MCD ont des niveaux plasmatiques de TSK encore plus élevés indiquant une association avec la sévérité de l'injure hépatique. Une corrélation est faite entre les niveaux d'ALT des animaux atteints de NASH et la quantité circulante de TSK. Dans nos études nous avons également montré l'induction de l'expression et de la sécrétion de TSK dans les modèles *db/db* et MCD. Nous n'avons pas réalisé d'étude combinant la diète MCD avec les souris *db/db*. Cependant, nous avons réalisé d'autres études dont l'utilisation du CCl<sub>4</sub> démontrant l'association entre la sévérité des dommages hépatiques et le degré d'induction d'expression et de sécrétion de TSK. De plus, nous avons mis en évidence l'importance du stress du RE, de l'inflammation, de l'accumulation de lipides et l'effet additifs des trois sur l'induction de TSK.

Dans cet article, Xiong *et al.* présentent les résultats d'une étude de NASH réversible. Les souris sont d'abord nourries avec une diète pour développer la NASH qui est changée par la suite pour une diète contrôle afin de résoudre la NASH avec une diminution de l'inflammation et de la fibrose. Dans ce contexte, les niveaux plasmatiques de TSK sont réduits avec la résolution de la stéatose. Notre étude de réversibilité de la stéatose hépatique utilisant la diète MCD montre aussi une association entre les niveaux d'expression et de sécrétion de TSK avec la résolution de la stéatose et notamment la diminution de TG hépatiques, du stress du RE et de l'inflammation.

Finalement, Xiong *et al.* étudient un modèle de souris *Tsk* nulles. Aucune différence n'est observée en conditions basales par rapport aux souris WT. Lorsque les souris TSK-

KO sont nourries avec une diète pour induire la NASH, celles-ci ont une masse corporelle, des poids de foie et de TA plus faibles. Les TG et NEFA plasmatiques sont similaires. En revanche, le cholestérol plasmatique des souris KO est plus faible que les souris WT, des résultats qui vont à l'opposé de ceux observés dans nos études. Les souris TSK-KO de cette étude présentent des niveaux d'ALT et AST plus faibles que les souris WT ainsi qu'une stéatose, une inflammation et une fibrose diminuées, des effets que nous n'avons pas observés dans nos études. Il est à noter qu'il n'y a pas de résultats présentés pour la condition diète contrôle entre les groupes de souris WT et KO. De plus, les résultats présentés ne prennent pas en compte que les souris TSK-KO sont plus petites, comme observé dans notre modèle. Les différences observées sur le poids des tissus entre les souris WT et KO, qui ne sont pas rapportés sur le poids corporel total, peuvent être expliquées par la plus petite taille des souris KO. Le groupe conclut à une protection des souris TSK-KO contre le développement de la NASH grâce à l'absence de TSK. Les effets protecteurs de l'absence de TSK contre la NASH n'ont pas été observés dans notre étude (514).

Une seconde publication du même groupe met en évidence un rôle de TSK dans la dépense énergétique. Wang *et al.* montrent que *Tsk* est majoritairement exprimé dans le foie et par les hépatocytes, des résultats qui correspondent à nos observations. Afin d'étudier un rôle potentiel de TSK dans la dépense énergétique, des souris ont été exposées au froid ou traitées avec l'hormone thyroïdienne T3 (*triiodothyronine*) ou du CL316,243, un agoniste du récepteur  $\beta$ 3-adrénergique. Dans ces différentes conditions, l'expression de *Tsk* est augmentée ainsi que ces niveaux plasmatiques. Nous avons également observé une augmentation de l'expression de *Tsk* en réponse au froid et au CL316,243 (chapitre 2). Les données collectées dans nos différentes études suggèrent une forte association entre l'accumulation de lipides dans le foie et l'expression de *Tsk*. Nous montrons que dans ces deux conditions la quantité de triglycérides hépatiques augmente. Ainsi l'induction d'expression de *Tsk* en réponse au froid et au CL316,243 semble être liée à l'augmentation de TG dans le foie.

Dans cette étude, les souris TSK-KO ont un poids inférieur et ne présentent pas de phénotype marqué par rapport aux souris WT en conditions basales. En revanche, sur une diète riche en gras les souris TSK-KO gagnent moins de poids. La glycémie et les niveaux plasmatiques de leptine et d'insuline sont réduits chez les souris TSK-KO. Les tests de tolérance au glucose et à l'insuline montrent une sensibilité à l'insuline et une tolérance au

glucose améliorées chez les souris TSK-KO. Les niveaux de TG et de cholestérol total sont inchangés. Les souris TSK-KO ont un foie plus petit qui contient une plus faible quantité de TG accumulés. Des différences histologiques sont observées au niveau du TA épидидymal des souris TSK-KO qui est plus petit que chez les souris WT. Les adipocytes du TA épидидymal sont plus petits et présentent moins de structure en forme de couronne suggérant une plus faible inflammation chez les souris TSK-KO. En réponse à la diète riche en gras, les souris WT accumulent des lipides dans leur TAB qui devient plus pâle traduisant une modification de la fonction des adipocytes bruns. En revanche, les souris TSK-KO présentent un TAB plus petit et plus brun suggérant une activation thermogénique plus importante. Dans les adipocytes bruns des souris TSK-KO, il y a une plus faible quantité de lipides accumulés et la taille des gouttelettes lipidiques est réduite. De plus, l'expression dans le TAB de certains gènes thermogéniques est augmentée chez les souris TSK-KO incluant *Dio2* et *Ucp1*. Les niveaux protéiques d'UCP1 ainsi que la phosphorylation de la lipase hormono-sensible (HSL) et de la protéine kinase A (PKA) sont aussi augmentés chez ces souris. Wang *et al.* expliquent ces résultats par la déficience de TSK qui augmente l'action adrénérergique et la stimulation thermogénique dans le TAB. Les résultats du groupe suggèrent un lien entre TSK et l'activation de la thermogénèse et de la dépense énergétique. Leurs souris TSK-KO présentent une température corporelle supérieure aux souris WT en conditions basales et en condition de jeûne. Nous avons mesuré la température corporelle dans notre modèle TSK-KO et n'avons pas observé de différence par rapport aux souris WT. L'utilisation de cage métabolique met en évidence un taux de dépense énergétique et un  $VO_2$  supérieurs chez les souris TSK-KO bien que la consommation alimentaire et l'activité locomotrice semble similaire entre les deux groupes. Ainsi, Wang *et al.* suggèrent que la déficience en TSK freine la boucle négative de rétroaction sur la dépense énergétique globale avec pour conséquence une résistance à l'obésité induite par la diète.

Pour pallier au potentiel mécanismes de compensation induits par la délétion de TSK au cours du développement, le groupe a réalisé un modèle CRISPR (*clustered regularly interspaced short palindromic repeats*) /Cas9 (*CRISPR associated protein-9nuclease*) utilisant des AAV (*adeno-associated virus*) pour déléter *Tsk* uniquement dans le foie chez des souris adultes. Lorsque ces souris sont soumises à une diète riche en gras, elles montrent une plus faible concentration plasmatique d'insuline et une sensibilité à l'insuline améliorée. Les souris TSK-KO accumulent moins de lipides dans le TAB. De plus, les souris TSK-KO montrent une augmentation des niveaux protéiques de TH (*tyrosine hydroxylase*) et UCP1, et de la signalisation adrénérergique. Des analyses histologiques

rèvent une augmentation de la quantité de marques positives de TH, correspondant aux fibres sympathiques, dans le TAB. Le groupe suggère un rôle de TSK comme point de contrôle pour l'innervation sympathique du TA. Les résultats publiés dans cette étude montrent que la dénervation du TAB chez les souris TSK-KO réduit l'induction de TH et de la phosphorylation du substrat de PKA, ainsi qu'une moindre induction de l'expression des gènes *Ucp1* et *Dio2*. Chez les souris TSK-KO, la dénervation du TAB est également responsable du blanchiment de ce dernier en réponse à une diète riche en gras en comparaison au contrôle non-dénervé.

Finalement, le groupe a exposé les souris à thermoneutralité afin de supprimer l'activité sympathique. Dans ces conditions, les souris TSK-KO nourries avec une diète riche en gras ne montrent plus de protection contre l'obésité et montrent un blanchiment de leur TAB. Le groupe explique ces résultats par l'augmentation de l'innervation sympathique qui sert d'intermédiaire aux effets de la déficience de TSK sur la thermogénèse du TAB et de la dépense énergétique. Le traitement de cellules *in vitro* avec la protéine TSK recombinante n'a pas d'effets sur la différenciation des adipocytes bruns et l'activation thermogénique. Elle n'a pas non plus d'effets sur la différenciation et la croissance des neurites. Wang *et al.* proposent TSK comme un régulateur négatif de l'innervation sympathique du TAB.

### **Pourquoi n'avons-nous pas le même phénotype dans nos modèles de souris ?**

Les résultats de nos travaux montrent des divergences avec les études publiées récemment sur TSK. En effet, contrairement aux études de Xiong *et al.* et Wang *et al.*, nous n'avons pas observé de phénotype marqué lié au développement de la NAFLD, de la fibrose, de l'obésité, ou à un rôle dans la thermogénèse (464,515). Les raisons de ces différences sont inconnues, cependant plusieurs éléments pourraient jouer un rôle dans ces différences.

Premièrement, il est important de mentionner que les modèles utilisés par nos groupes respectifs ont été générés par 2 groupes indépendants en utilisant des cellules souches embryonnaires provenant de différentes souches de souris (129S5/SvEvBrd vs. C57BL6 x CBA) (516,517). Bien que les deux modèles de souris KO aient été rétro-croisées avec des souris C57BL/6J pendant 6 générations, des différences dans le fond génétique ont pu persister. Ces différences peuvent être suffisantes pour modifier la réponse de la perte de TSK. En effet, la contribution du patrimoine génétique à la sensibilité à l'obésité et aux perturbations métaboliques liées à l'obésité est décrite dans la littérature (518–520). Dans nos travaux nous n'avons observé aucun effet de la perte de TSK sur l'obésité induite

par la diète alors que Xiong *et al.* ont montré que l'absence de TSK protège de l'obésité (515). L'obésité possède un rôle central dans la promotion de la NAFLD (224,521). Ainsi, l'amélioration de la pathologie hépatique observée par Xiong *et al.* pourrait être une conséquence indirecte de la réduction du poids corporel de ces souris (515). La raison pour laquelle nos modèles de souris TSK-KO respectifs montrent une sensibilité différente à la prise de poids est inconnue. Cependant, les différences génétiques pourraient être responsable de cette différence de sensibilité entre les lignées de souris TSK utilisées. De plus, l'impact du contexte génétique sur la thermogenèse est bien décrit dans la littérature (477,522). Une étude a montré que le modèle de souris TSK-KO utilisé par Wang *et al.* présente un retard dans le développement du cycle capillaire (491), un phénotype que nous n'avons pas observé dans notre modèle (514). Ce modèle de souris TSK-KO présente également des défauts cutanés (473). Les changements de la qualité de la peau, de la fourrure et des cheveux peuvent réduire l'isolation et favoriser la perte de chaleur. Ces éléments peuvent activer le système nerveux sympathique et augmenter la dépense énergétique (523). Il est donc possible que l'association entre la thermogenèse dans le TAB et TSK rapportée par Wang *et al.* soit une conséquence d'un défaut de conservation de chaleur. Cette hypothèse est appuyée par le fait que leurs souris TSK-KO ne présentent plus d'activité élevée du BAT et de protection contre l'obésité lorsqu'elles sont hébergées à thermoneutralité (464).

Enfin, nous ne pouvons pas exclure la possibilité que des variations dans la composition du régime alimentaire, les conditions d'hébergement ou la composition du microbiote intestinal aient pu affecter les résultats de nos études respectives. En effet, les protocoles utilisés pour induire la NAFLD dans nos études sont différents. Xiong *et al.* ont utilisé une diète contenant du fructose, du gras et du cholestérol pendant 6 mois permettant d'induire des dommages hépatiques sévères (515). Dans notre cas, nous avons utilisé une diète contenant majoritairement du gras pendant 4 mois. Nous avons également étudié l'impact de la perte de TSK chez des souris *ob/ob* et des souris nourries avec une diète MCD. Bien que ces différents modèles induisent tous la NAFLD, le degré de stéatose, d'inflammation et de fibrose étaient probablement plus faible que le modèle utilisé par Xiong *et al.* (515). Il est donc possible que l'effet bénéfique de la perte de TSK soit observé dans des conditions d'altérations sévères. D'autre part, il est possible que des variations dans les conditions d'hébergement et de manipulation puissent affecter les résultats des différentes études (524). Dans les dernières années, l'importance du microbiote intestinal a été mis en évidence dans de nombreux processus. Ainsi, il est possible qu'une différence de microbiote

intestinal soit en partie responsable des différences observées entre nos études (524). Afin de clarifier l'impact réel de la perte de TSK en contexte de NAFLD, un échange de modèle de souris pourrait être effectué entre nos groupes. De plus, les diètes utilisées pour induire la NASH étant différentes, il pourrait être intéressant de réaliser une étude avec nos souris KO et surexprimeur en utilisant une diète spécifique au développement de la NASH.

### **Perspectives de recherche.**

Les hépatokines sont des facteurs reconnus pour avoir la capacité d'affecter les tissus périphériques. Malgré les nombreuses hépatokines identifiées pour jouer un rôle en contexte d'obésité et/ou de NAFLD, il n'existe toujours aucun biomarqueur et traitement spécifique de la NAFLD. Le foie étant un organe sécrétoire majeur, il reste encore de nombreuses hépatokines non identifiées. Les travaux décrits dans cette thèse identifient TSK comme une nouvelle hépatokine sécrétée en réponse à la NAFLD. Nous avons montré que TSK est régulée par l'accumulation de lipides, le stress du RE et l'inflammation, des éléments associés aux dommages hépatiques. De plus, nous avons vu que TSK module le cholestérol HDL, le transport inverse du cholestérol et les acides biliaires dans le foie.

Nous avons montré que l'expression de TSK est majoritairement hépatique. Le modèle de souris TSK-KO utilisé dans ces travaux n'est pas foie spécifique et a montré un phénotype mineur. Les données dans la littérature sur les protéines de la famille des SLRPs montrent la mise en place de mécanismes de compensation dans certains modèles KO. Pour écarter la présence de tels mécanismes dans notre modèle, il serait intéressant d'utiliser un modèle de délétion de *Tsk* spécifique au foie en utilisant par exemple la technique CRISPR/Cas9.

D'autre part, nous avons montré que TSK module le métabolisme du cholestérol dans le foie. Sachant que TSK est une protéine sécrétée, il est possible qu'elle ait également un rôle dans d'autres tissus. Il serait intéressant d'identifier le récepteur de TSK. Ainsi, il serait possible d'identifier la ou les voie(s) de signalisation modulée(s) par TSK. Cela permettrait également d'approfondir les connaissances relatives aux mécanismes impliqués dans les effets de TSK sur le métabolisme du cholestérol. Tel que décrit dans l'introduction de cette thèse, les mécanismes liant la NAFLD à la dyslipidémie athérogène et l'athérosclérose ne sont pas connus. Ici, TSK représente un lien potentiel entre les deux pathologies. D'autant plus que TSK appartient à la famille de protéine des SLRPs connue pour avoir diverses fonctions incluant la structure et la composition de la matrice extracellulaire, la rétention des lipides et la calcification des artères dans l'athérosclérose.

Par exemple, le modèle de souris LDLr-KO, un modèle utilisé pour étudier l'athérosclérose chez la souris (525,526), combiné à une surexpression ou une perte de TSK spécifique au foie permettrait d'étudier si TSK a une fonction dans le développement ou la progression de la dyslipidémie athérogène et de l'athérosclérose.

Dans un autre registre, nous avons montré que TSK est induite en réponse à l'accumulation de lipides, au stress du RE et à l'inflammation dans le foie en contexte de NAFLD. Nous nous sommes concentrés sur des modèles de NAFLD et/ou d'obésité. La lipodystrophie est une pathologie caractérisée par une quasi ou totale absence de TA avec pour conséquence une accumulation d'AG dans les tissus périphériques incluant le foie. Ainsi, les individus atteints de lipodystrophie présentent des foies gras avec des risques d'évolution vers la cirrhose. Il pourrait être intéressant d'étudier les niveaux de TSK dans un modèle murin de lipodystrophie ou dans le plasma d'humains atteints de cette pathologie. TSK pourrait être utilisé comme un biomarqueur de la santé hépatique générale et être utilisé dans plusieurs pathologies présentant une NAFLD et/ou des dommages hépatiques.

Au cours des prochaines années, il serait intéressant d'approfondir les études chez l'humain. Nous avons montré que *TSK* est plus exprimée chez les patients ayant une plus grande quantité de triglycérides hépatiques. Il pourrait être intéressant de mesurer les niveaux de TSK dans différents groupes de patients obèses avec ou sans comorbidités associées et observer si les niveaux de TSK peuvent être associés à des déterminants métaboliques ou des traitements. Dans le même ordre d'idée, il serait intéressant de mesurer les niveaux de TSK dans le plasma d'une cohorte de patients obèses avant et après une chirurgie bariatrique. Il est connu que la chirurgie a des effets bénéfiques sur des paramètres métaboliques incluant le diabète de type 2, les niveaux de lipides dans le sang et le foie (9,527). Finalement, nous avons observé une potentielle association entre les niveaux de TSK sanguins et la survie des patients admis aux urgences pour une défaillance hépatique aiguë causée par l'acétaminophène. Il est nécessaire de reproduire ces observations dans une plus grande cohorte de patients et déterminer si TSK peut être utilisé comme un biomarqueur sanguin pour déterminer la nécessité de transplanter les patients admis aux urgences pour ce genre de pathologie.

## Conclusion

Les travaux exposés dans cet ouvrage ont permis d'identifier une nouvelle hépatokine exprimée et sécrétée par le foie en réponse à la NAFLD. Les études décrites dans cette thèse ont démontré que TSK est régulée par l'accumulation de lipides, le stress du RE et l'inflammation, des conditions fortement liées à la NAFLD. Nous avons montré que la sécrétion de TSK est plus importante que son expression suggérant des mécanismes de régulation de sa sécrétion et de sa biodisponibilité. Le profil de libération laisse penser que TSK est séquestrée dans la matrice extracellulaire prête à être libérée en réponse aux dommages hépatiques. Les études effectuées indiquent une induction de l'expression et de la sécrétion de TSK d'autant plus importante lorsque l'accumulation de lipides, le stress du RE et l'inflammation sont élevés. Chez l'humain, nous avons rapporté que TSK est présente en grande quantité dans le sang dans un contexte de dommages hépatiques importants chez des patients souffrants de défaillance hépatique aigue. Ces études ont de plus montré que TSK n'a pas de rôle dans le développement et la sévérité de la NAFLD. En revanche, elles ont permis de mettre en évidence que TSK affecte l'homéostasie du cholestérol en modulant le cholestérol HDL, le transport inverse du cholestérol et la synthèse des acides biliaires dans le foie. L'ensemble de ces résultats montrent que TSK pourrait représenter un nouveau biomarqueur du stress hépatique liant la NAFLD à la dyslipidémie athérogène et à l'athérosclérose. Des études additionnelles sont requises pour définir le rôle de TSK dans la régulation du métabolisme du cholestérol et de l'athérosclérose chez l'humain.

## Bibliographie

1. World Health Organization. Obesity and Overweight [Internet]. World Health Organization; 2016 juin. Disponible sur: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>
2. Ng M, Fleming T, Robinson M, Thomson B, Graetz N, Margono C, et al. Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *The Lancet*. 384(9945):766-81.
3. Pilitsi E, Farr OM, Polyzos SA, Perakakis N, Nolen-Doerr E, Papathanasiou A-E, et al. Pharmacotherapy of obesity: Available medications and drugs under investigation. *Metabolism*. 1 mars 2019;92:170-92.
4. Rosa-Gonçalves P, Majerowicz D. Pharmacotherapy of Obesity: Limits and Perspectives. *American Journal of Cardiovascular Drugs*. 1 août 2019;19(4):349-64.
5. Srivastava G, Apovian CM. Current pharmacotherapy for obesity. *Nature Reviews Endocrinology*. 1 janv 2018;14(1):12-24.
6. The Committee to Develop Criteria for Evaluating the Outcomes of Approaches to Prevent and Treat Obesity. Weighing the Options: Criteria for Evaluating Weight-Management Programs. *Obesity Research*. 1 nov 1995;3(6):591-604.
7. Wing RR, Phelan S. Long-term weight loss maintenance. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 1 juill 2005;82(1):222S-225S.
8. Kassirer JP, Angell M. Losing Weight — An Ill-Fated New Year's Resolution. *N Engl J Med*. 1 janv 1998;338(1):52-4.
9. Shah M, Simha V, Garg A. Long-Term Impact of Bariatric Surgery on Body Weight, Comorbidities, and Nutritional Status. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 1 nov 2006;91(11):4223-31.
10. Tchkonja T, E. Corkey B, L. Kirkland J. Current Views of the Fat Cell as an Endocrine Cell: Lipotoxicity. In: *Overweight and the Metabolic Syndrome: From Bench to Bedside*. George A. Bray & Donna H. Ryan. 2006. p. 105-22. (Springer).
11. Goossens GH. The Metabolic Phenotype in Obesity: Fat Mass, Body Fat Distribution, and Adipose Tissue Function. *Obesity Facts*. 2017;10(3):207-15.

12. Piché M-E, Poirier P, Lemieux I, Després J-P. Overview of Epidemiology and Contribution of Obesity and Body Fat Distribution to Cardiovascular Disease: An Update. *Progress in Cardiovascular Diseases*. 1 juill 2018;61(2):103-13.
13. Tchkonia T, Thomou T, Zhu Y, Karagiannides I, Pothoulakis C, Jensen MD, et al. Mechanisms and Metabolic Implications of Regional Differences among Fat Depots. *Cell Metabolism*. 7 mai 2013;17(5):644-56.
14. White U, Ravussin E. Dynamics of adipose tissue turnover in human metabolic health and disease. *Diabetologia*. 1 janv 2019;62(1):17-23.
15. Baglioni S, Cantini G, Poli G, Francalanci M, Squecco R, Di Franco A, et al. Functional differences in visceral and subcutaneous fat pads originate from differences in the adipose stem cell. *PLoS ONE*. 2012;7(5):e36569.
16. Tchoukalova YD, Votruba SB, Tchkonia T, Giorgadze N, Kirkland JL, Jensen MD. Regional differences in cellular mechanisms of adipose tissue gain with overfeeding. *Proc Natl Acad Sci USA*. 19 oct 2010;107(42):18226.
17. Shi H, Clegg DJ. Sex differences in the regulation of body weight. *Physiology & Behavior*. 25 mai 2009;97(2):199-204.
18. Wajchenberg BL, Giannella-Neto D, da Silva MER, Santos RF. Depot-Specific Hormonal Characteristics of Subcutaneous and Visceral Adipose Tissue and their Relation to the Metabolic Syndrome. *Horm Metab Res*. 27 mars 2003;34(11/12):616-21.
19. Arner P, Hellström L, Wahrenberg H, Brönnegård M. Beta-adrenoceptor expression in human fat cells from different regions. *J Clin Invest*. 1 nov 1990;86(5):1595-600.
20. Tchernof A, Després J-P. Pathophysiology of Human Visceral Obesity: An Update. *Physiol Rev*. 9 janv 2013;93(1):359.
21. Harms M, Seale P. Brown and beige fat: development, function and therapeutic potential. *Nature Medicine*. 1 oct 2013;19(10):1252-63.
22. Ricquier D. Respiration uncoupling and metabolism in the control of energy expenditure. *Proceedings of the Nutrition Society*. 2007/03/07 éd. 2005;64(1):47-52.
23. Cypess AM, Kahn CR. Brown fat as a therapy for obesity and diabetes. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*. avr 2010;17(2):143-9.
24. Nedergaard J, Golozoubova V, Matthias A, Asadi A, Jacobsson A, Cannon B. UCP1:

the only protein able to mediate adaptive non-shivering thermogenesis and metabolic inefficiency. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. 1 mars 2001;1504(1):82-106.

25. Giralt M, Villarroya F. White, Brown, Beige/Brite: Different Adipose Cells for Different Functions? *Endocrinology*. 1 sept 2013;154(9):2992-3000.

26. Pradhan RN, Zachara M, Deplancke B. A systems perspective on brown adipogenesis and metabolic activation. *Obesity Reviews*. 1 févr 2017;18(S1):65-81.

27. Himms-Hagen J. Brown adipose tissue thermogenesis and obesity. *Progress in Lipid Research*. 1 janv 1989;28(2):67-115.

28. Trayhurn P. Origins and early development of the concept that brown adipose tissue thermogenesis is linked to energy balance and obesity. *Biochimie*. 1 mars 2017;134:62-70.

29. Ghorbani M, Claus TH, Himms-Hagen J. Hypertrophy of brown adipocytes in brown and white adipose tissues and reversal of diet-induced obesity in rats treated with a  $\beta$ 3-adrenoceptor agonist. *Biochemical Pharmacology*. 1 juill 1997;54(1):121-31.

30. Guerra C, Koza RA, Yamashita H, Walsh K, Kozak LP. Emergence of brown adipocytes in white fat in mice is under genetic control. Effects on body weight and adiposity. *J Clin Invest*. 15 juill 1998;102(2):412-20.

31. Lowell BB, S-Susulic V, Hamann A, Lawitts JA, Himms-Hagen J, Boyer BB, et al. Development of obesity in transgenic mice after genetic ablation of brown adipose tissue. *Nature*. 1 déc 1993;366(6457):740-2.

32. Heaton JM. The distribution of brown adipose tissue in the human. *J Anat*. mai 1972;112(Pt 1):35-9.

33. Lidell ME, Betz MJ, Leinhard OD, Heglind M, Elander L, Slawik M, et al. Evidence for two types of brown adipose tissue in humans. *Nature Medicine*. 1 mai 2013;19(5):631-4.

34. Cypess AM, Lehman S, Williams G, Tal I, Rodman D, Goldfine AB, et al. Identification and Importance of Brown Adipose Tissue in Adult Humans. *N Engl J Med*. 9 avr 2009;360(15):1509-17.

35. Nedergaard J, Bengtsson T, Cannon B. Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. 1 août 2007;293(2):E444-52.

36. Saito M, Okamatsu-Ogura Y, Matsushita M, Watanabe K, Yoneshiro T, Nio-Kobayashi J, et al. High Incidence of Metabolically Active Brown Adipose Tissue in Healthy Adult Humans. *Diabetes*. 1 juill 2009;58(7):1526.
37. van Marken Lichtenbelt WD, Vanhommelrig JW, Smulders NM, Drossaerts JMAFL, Kemerink GJ, Bouvy ND, et al. Cold-Activated Brown Adipose Tissue in Healthy Men. *N Engl J Med*. 9 avr 2009;360(15):1500-8.
38. Virtanen KA, Lidell ME, Orava J, Heglind M, Westergren R, Niemi T, et al. Functional Brown Adipose Tissue in Healthy Adults. *N Engl J Med*. 9 avr 2009;360(15):1518-25.
39. Trayhurn P. Brown Adipose Tissue-A Therapeutic Target in Obesity? *Front Physiol*. 23 nov 2018;9:1672-1672.
40. Petrovic N, Walden TB, Shabalina IG, Timmons JA, Cannon B, Nedergaard J. Chronic Peroxisome Proliferator-activated Receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) Activation of Epididymally Derived White Adipocyte Cultures Reveals a Population of Thermogenically Competent, UCP1-containing Adipocytes Molecularly Distinct from Classic Brown Adipocytes. *Journal of Biological Chemistry*. 5 mars 2010;285(10):7153-64.
41. Ishibashi J, Seale P. Medicine. Beige can be slimming. *Science*. 2010/05/06 éd. 28 mai 2010;328(5982):1113-4.
42. Wu J, Boström P, Sparks LM, Ye L, Choi JH, Giang A-H, et al. Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. *Cell*. 2012/07/12 éd. 20 juill 2012;150(2):366-76.
43. Blüher M. Obesity: global epidemiology and pathogenesis. *Nature Reviews Endocrinology*. 1 mai 2019;15(5):288-98.
44. Samuel VT, Shulman GI. Mechanisms for Insulin Resistance: Common Threads and Missing Links. *Cell*. 2 mars 2012;148(5):852-71.
45. USUI C, ASAKA M, KAWANO H, AOYAMA T, ISHIJIMA T, SAKAMOTO S, et al. Visceral Fat Is a Strong Predictor of Insulin Resistance Regardless of Cardiorespiratory Fitness in Non-Diabetic People. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*. 2010;56(2):109-16.
46. Gastaldelli A, Miyazaki Y, Pettiti M, Matsuda M, Mahankali S, Santini E, et al. Metabolic Effects of Visceral Fat Accumulation in Type 2 Diabetes. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 1 nov 2002;87(11):5098-103.

47. Wang Y, Rimm EB, Stampfer MJ, Willett WC, Hu FB. Comparison of abdominal adiposity and overall obesity in predicting risk of type 2 diabetes among men. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 1 mars 2005;81(3):555-63.
48. Balkau B, Deanfield JE, Després J-P, Bassand J-P, Fox KAA, Smith SC Jr, et al. International Day for the Evaluation of Abdominal Obesity (IDEA): a study of waist circumference, cardiovascular disease, and diabetes mellitus in 168,000 primary care patients in 63 countries. *Circulation*. 23 oct 2007;116(17):1942-51.
49. Després J. Abdominal obesity as important component of insulin-resistance syndrome. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif)*. 1993;9(5):452-9.
50. Boyko EJ, Fujimoto WY, Leonetti DL, Newell-Morris L. Visceral adiposity and risk of type 2 diabetes: a prospective study among Japanese Americans. *Diabetes Care*. 1 avr 2000;23(4):465.
51. Karter AJ, D'Agostino Jr RB, Mayer-Davis EJ, Wagenknecht LE, Hanley AJG, Hamman RF, et al. Abdominal obesity predicts declining insulin sensitivity in non-obese normoglycaemics: the Insulin Resistance Atherosclerosis Study (IRAS). *Diabetes, Obesity and Metabolism*. 1 mai 2005;7(3):230-8.
52. White MF, Shoelson SE, Keutmann H, Kahn CR. A cascade of tyrosine autophosphorylation in the beta-subunit activates the phosphotransferase of the insulin receptor. *Journal of Biological Chemistry*. 25 févr 1988;263(6):2969-80.
53. Alessi DR, Cohen P. Mechanism of activation and function of protein kinase B. *Current Opinion in Genetics & Development*. 1 févr 1998;8(1):55-62.
54. Kotani K, Ogawa W, Matsumoto M, Kitamura T, Sakaue H, Hino Y, et al. Requirement of atypical protein kinase clambda for insulin stimulation of glucose uptake but not for Akt activation in 3T3-L1 adipocytes. *Mol Cell Biol*. déc 1998;18(12):6971-82.
55. Harris TE, Lawrence JC. TOR Signaling. *Sci STKE*. 9 déc 2003;2003(212):re15.
56. Cohen P, Frame S. The renaissance of GSK3. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 1 oct 2001;2(10):769-76.
57. Accili D, Arden KC. FoxOs at the Crossroads of Cellular Metabolism, Differentiation, and Transformation. *Cell*. 14 mai 2004;117(4):421-6.
58. Sano H, Kane S, Sano E, Mîinea CP, Asara JM, Lane WS, et al. Insulin-stimulated

Phosphorylation of a Rab GTPase-activating Protein Regulates GLUT4 Translocation. *Journal of Biological Chemistry*. 25 avr 2003;278(17):14599-602.

59. Cheatham B, Vlahos CJ, Cheatham L, Wang L, Blenis J, Kahn CR. Phosphatidylinositol 3-kinase activation is required for insulin stimulation of pp70 S6 kinase, DNA synthesis, and glucose transporter translocation. *Mol Cell Biol*. juill 1994;14(7):4902-11.

60. Shepherd PR, Navé BT, Siddle K. Insulin stimulation of glycogen synthesis and glycogen synthase activity is blocked by wortmannin and rapamycin in 3T3-L1 adipocytes: evidence for the involvement of phosphoinositide 3-kinase and p70 ribosomal protein-S6 kinase. *Biochem J*. 1 janv 1995;305 ( Pt 1)(Pt 1):25-8.

61. Svendsen AM, Winge SB, Zimmermann M, Lindvig AB, Warzecha CB, Sajid W, et al. Down-regulation of cyclin G2 by insulin, IGF-I (insulin-like growth factor 1) and X10 (AspB10 insulin): role in mitogenesis. *Biochemical Journal*. 10 déc 2013;457(1):69-77.

62. Poloz Y, Stambolic V. Obesity and cancer, a case for insulin signaling. *Cell Death & Disease*. 1 déc 2015;6(12):e2037-e2037.

63. Prager R, Wallace P, Olefsky JM. Direct and indirect effects of insulin to inhibit hepatic glucose output in obese subjects. *Diabetes*. mai 1987;36(5):607-11.

64. Hirosumi J, Tuncman G, Chang L, Gorgun CZ, Uysal KT, Maeda K, et al. A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature*. 21 nov 2002;420(6913):333-6.

65. Ter Horst KW, Gilihamse PW, Versteeg RI, Ackermans MT, Nederveen AJ, la Fleur SE, et al. Hepatic Diacylglycerol-Associated Protein Kinase Cε Translocation Links Hepatic Steatosis to Hepatic Insulin Resistance in Humans. *Cell Rep*. 6 juin 2017;19(10):1997-2004.

66. Samuel VT, Liu Z-X, Wang A, Beddow SA, Geisler JG, Kahn M, et al. Inhibition of protein kinase Cε prevents hepatic insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Invest*. 1 mars 2007;117(3):739-45.

67. Boucher J, Kleinridders A, Kahn CR. Insulin Receptor Signaling in Normal and Insulin-Resistant States. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* [Internet]. 1 janv 2014;6(1). Disponible sur: <http://cshperspectives.cshlp.org/content/6/1/a009191.abstract>

68. Ferreira LDMC-B, Pulawa LK, Jensen DR, Eckel RH. Overexpressing Human Lipoprotein Lipase in Mouse Skeletal Muscle Is Associated With Insulin Resistance. *Diabetes*. 1 mai 2001;50(5):1064.

69. Perla MF, Prelati M, Lavorato M, Visicchio D, Anania C. The Role of Lipid and Lipoprotein Metabolism in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Children*. 2017;4(6).
70. Chiu Hsiu-Chiang, Kovacs Attila, Blanton Robert M., Han Xianlin, Courtois Michael, Weinheimer Carla J., et al. Transgenic Expression of Fatty Acid Transport Protein 1 in the Heart Causes Lipotoxic Cardiomyopathy. *Circulation Research*. 4 févr 2005;96(2):225-33.
71. Koonen DPY, Jacobs RL, Febbraio M, Young ME, Soltys C-LM, Ong H, et al. Increased Hepatic CD36 Expression Contributes to Dyslipidemia Associated With Diet-Induced Obesity. *Diabetes*. 1 déc 2007;56(12):2863.
72. Petersen MC, Shulman GI. Roles of Diacylglycerols and Ceramides in Hepatic Insulin Resistance. *Trends Pharmacol Sci*. 2017/05/24 éd. juill 2017;38(7):649-65.
73. Shi H, Kokoeva MV, Inouye K, Tzameli I, Yin H, Flier JS. TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. *J Clin Invest*. 2006/10/19 éd. nov 2006;116(11):3015-25.
74. Boden G. Role of Fatty Acids in the Pathogenesis of Insulin Resistance and NIDDM. *Diabetes*. 1 janv 1997;46(1):3.
75. Aguirre V, Uchida T, Yenush L, Davis R, White MF. The c-Jun NH2-terminal Kinase Promotes Insulin Resistance during Association with Insulin Receptor Substrate-1 and Phosphorylation of Ser307. *Journal of Biological Chemistry*. 24 mars 2000;275(12):9047-54.
76. Solinas G, Becattini B. JNK at the crossroad of obesity, insulin resistance, and cell stress response. *Mol Metab*. 8 déc 2016;6(2):174-84.
77. Zhang X, Xu A, Chung SK, Cresser JHB, Sweeney G, Wong RLC, et al. Selective inactivation of c-Jun NH2-terminal kinase in adipose tissue protects against diet-induced obesity and improves insulin sensitivity in both liver and skeletal muscle in mice. *Diabetes*. févr 2011;60(2):486-95.
78. Sabio G, Cavanagh-Kyros J, Ko HJ, Jung DY, Gray S, Jun JY, et al. Prevention of steatosis by hepatic JNK1. *Cell Metab*. déc 2009;10(6):491-8.
79. Wu JJ, Roth RJ, Anderson EJ, Hong E-G, Lee M-K, Choi CS, et al. Mice lacking MAP kinase phosphatase-1 have enhanced MAP kinase activity and resistance to diet-induced obesity. *Cell Metab*. juill 2006;4(1):61-73.
80. Yu C, Chen Y, Cline GW, Zhang D, Zong H, Wang Y, et al. Mechanism by Which

Fatty Acids Inhibit Insulin Activation of Insulin Receptor Substrate-1 (IRS-1)-associated Phosphatidylinositol 3-Kinase Activity in Muscle. *Journal of Biological Chemistry*. 27 déc 2002;277(52):50230-6.

81. Westwick JK, Bielawska AE, Dbaibo G, Hannun YA, Brenner DA. Ceramide Activates the Stress-activated Protein Kinases. *Journal of Biological Chemistry*. 29 sept 1995;270(39):22689-92.

82. Schmitz-Peiffer C, Whitehead J. IRS-1 Regulation in Health and Disease. *IUBMB Life*. 1 juill 2003;55(7):367-74.

83. Zick Y. Ser/Thr Phosphorylation of IRS Proteins: A Molecular Basis for Insulin Resistance. *Sci STKE*. 25 janv 2005;2005(268):pe4.

84. Petersen MC, Madiraju AK, Gassaway BM, Marcel M, Nasiri AR, Butrico G, et al. Insulin receptor Thr1160 phosphorylation mediates lipid-induced hepatic insulin resistance. *J Clin Invest*. 1 nov 2016;126(11):4361-71.

85. Liu L, Zhang Y, Chen N, Shi X, Tsang B, Yu Y-H. Upregulation of myocellular DGAT1 augments triglyceride synthesis in skeletal muscle and protects against fat-induced insulin resistance. *J Clin Invest*. 2007/05/17 éd. juin 2007;117(6):1679-89.

86. Kumashiro N. Cellular mechanism of insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011;108.

87. Magkos F, Su X, Bradley D, Fabbrini E, Conte C, Eagon JC, et al. Intrahepatic Diacylglycerol Content Is Associated With Hepatic Insulin Resistance in Obese Subjects. *Gastroenterology*. 1 juin 2012;142(7):1444-1446.e2.

88. Luukkonen PK, Zhou Y, Sädevirta S, Leivonen M, Arola J, Orešič M, et al. Hepatic ceramides dissociate steatosis and insulin resistance in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of Hepatology*. 1 mai 2016;64(5):1167-75.

89. Salinas M, López-Valdaliso R, Martín D, Alvarez A, Cuadrado A. Inhibition of PKB/Akt1 by C2-Ceramide Involves Activation of Ceramide-Activated Protein Phosphatase in PC12 Cells. *Molecular and Cellular Neuroscience*. 1 févr 2000;15(2):156-69.

90. Schubert KM, Scheid MP, Duronio V. Ceramide Inhibits Protein Kinase B/Akt by Promoting Dephosphorylation of Serine 473. *Journal of Biological Chemistry*. 5 mai 2000;275(18):13330-5.

91. Stratford S, Hoehn KL, Liu F, Summers SA. Regulation of Insulin Action by Ceramide: DUAL MECHANISMS LINKING CERAMIDE ACCUMULATION TO THE INHIBITION OF Akt/PROTEIN KINASE B. *Journal of Biological Chemistry*. 27 août 2004;279(35):36608-15.
92. Powell DJ, Hajduch E, Kular G, Hundal HS. Ceramide disables 3-phosphoinositide binding to the pleckstrin homology domain of protein kinase B (PKB)/Akt by a PKCzeta-dependent mechanism. *Mol Cell Biol*. nov 2003;23(21):7794-808.
93. Millward TA, Zolnierowicz S, Hemmings BA. Regulation of protein kinase cascades by protein phosphatase 2A. *Trends in Biochemical Sciences*. 1 mai 1999;24(5):186-91.
94. Khoshnan A, Bae D, Tindell CA, Nel AE. The Physical Association of Protein Kinase C $\theta$  with a Lipid Raft-Associated Inhibitor of  $\kappa$ B Factor Kinase (IKK) Complex Plays a Role in the Activation of the NF- $\kappa$ B Cascade by TCR and CD28. *J Immunol*. 15 déc 2000;165(12):6933.
95. Jaeschke A, Davis RJ. Metabolic stress signaling mediated by mixed-lineage kinases. *Mol Cell*. 3 août 2007;27(3):498-508.
96. Aguirre V, Werner ED, Giraud J, Lee YH, Shoelson SE, White MF. Phosphorylation of Ser307 in Insulin Receptor Substrate-1 Blocks Interactions with the Insulin Receptor and Inhibits Insulin Action. *Journal of Biological Chemistry*. 11 janv 2002;277(2):1531-7.
97. Zhang J, Gao Z, Yin J, Quon MJ, Ye J. S6K directly phosphorylates IRS-1 on Ser-270 to promote insulin resistance in response to TNF-(alpha) signaling through IKK2. *J Biol Chem*. 2008/10/24 éd. 19 déc 2008;283(51):35375-82.
98. Fan Y, Yu Y, Shi Y, Sun W, Xie M, Ge N, et al. Lysine 63-linked polyubiquitination of TAK1 at lysine 158 is required for tumor necrosis factor alpha- and interleukin-1beta-induced IKK/NF-kappaB and JNK/AP-1 activation. *J Biol Chem*. 2009/12/28 éd. 19 févr 2010;285(8):5347-60.
99. Rotter V, Nagaev I, Smith U. Interleukin-6 (IL-6) Induces Insulin Resistance in 3T3-L1 Adipocytes and Is, Like IL-8 and Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ , Overexpressed in Human Fat Cells from Insulin-resistant Subjects. *Journal of Biological Chemistry*. 14 nov 2003;278(46):45777-84.
100. Jager J, Grémeaux T, Cormont M, Le Marchand-Brustel Y, Tanti J-F. Interleukin-1beta-induced insulin resistance in adipocytes through down-regulation of insulin receptor

substrate-1 expression. *Endocrinology*. 2006/10/12 éd. janv 2007;148(1):241-51.

101. Stepan CM, Wang J, Whiteman EL, Birnbaum MJ, Lazar MA. Activation of SOCS-3 by resistin. *Mol Cell Biol*. févr 2005;25(4):1569-75.

102. Kamei N, Tobe K, Suzuki R, Ohsugi M, Watanabe T, Kubota N, et al. Overexpression of Monocyte Chemoattractant Protein-1 in Adipose Tissues Causes Macrophage Recruitment and Insulin Resistance. *Journal of Biological Chemistry*. 8 sept 2006;281(36):26602-14.

103. Kawai T, Akira S. Signaling to NF- $\kappa$ B by Toll-like receptors. *Trends in Molecular Medicine*. 1 nov 2007;13(11):460-9.

104. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen Recognition and Innate Immunity. *Cell*. 24 févr 2006;124(4):783-801.

105. Reyna SM, Ghosh S, Tantiwong P, Meka CSR, Eagan P, Jenkinson CP, et al. Elevated toll-like receptor 4 expression and signaling in muscle from insulin-resistant subjects. *Diabetes*. 2008/07/15 éd. oct 2008;57(10):2595-602.

106. Lee JY, Sohn KH, Rhee SH, Hwang D. Saturated Fatty Acids, but Not Unsaturated Fatty Acids, Induce the Expression of Cyclooxygenase-2 Mediated through Toll-like Receptor 4. *Journal of Biological Chemistry*. 18 mai 2001;276(20):16683-9.

107. Hager SR, Jochen AL, Kalkhoff RK. Insulin resistance in normal rats infused with glucose for 72 h. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. 1 mars 1991;260(3):E353-62.

108. Kim JK, Zisman A, Fillmore JJ, Peroni OD, Kotani K, Perret P, et al. Glucose toxicity and the development of diabetes in mice with muscle-specific inactivation of GLUT4. *J Clin Invest*. juill 2001;108(1):153-60.

109. Miele C, Riboulet A, Maitan MA, Oriente F, Romano C, Formisano P, et al. Human Glycated Albumin Affects Glucose Metabolism in L6 Skeletal Muscle Cells by Impairing Insulin-induced Insulin Receptor Substrate (IRS) Signaling through a Protein Kinase C $\alpha$ -mediated Mechanism. *Journal of Biological Chemistry*. 28 nov 2003;278(48):47376-87.

110. Cassese A, Esposito I, Fiory F, Barbagallo APM, Paturzo F, Mirra P, et al. In skeletal muscle advanced glycation end products (AGEs) inhibit insulin action and induce the formation of multimolecular complexes including the receptor for AGEs. *J Biol Chem*. 2008/10/27 éd. 26 déc 2008;283(52):36088-99.

111. Mahadev K, Zilbering A, Zhu L, Goldstein BJ. Insulin-stimulated Hydrogen Peroxide Reversibly Inhibits Protein-tyrosine Phosphatase 1B in Vivo and Enhances the Early Insulin Action Cascade. *Journal of Biological Chemistry*. 15 juin 2001;276(24):21938-42.
112. Evans JL, Maddux BA, Goldfine ID. The Molecular Basis for Oxidative Stress-Induced Insulin Resistance. *Antioxidants & Redox Signaling*. 1 juill 2005;7(7-8):1040-52.
113. Dokken BB, Saengsirisuwan V, Kim JS, Teachey MK, Henriksen EJ. Oxidative stress-induced insulin resistance in rat skeletal muscle: role of glycogen synthase kinase-3. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. 1 mars 2008;294(3):E615-21.
114. Rösen P, Nawroth PP, King G, Möller W, Tritschler H-J, Packer L. The role of oxidative stress in the onset and progression of diabetes and its complications: a summary of a Congress Series sponsored by UNESCO-MCBN, the American Diabetes Association and the German Diabetes Society. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*. 1 mai 2001;17(3):189-212.
115. Fridlyand LE, Philipson LH. Reactive species and early manifestation of insulin resistance in type 2 diabetes. *Diabetes, Obesity and Metabolism*. 1 mars 2006;8(2):136-45.
116. Jheng H-F, Tsai P-J, Guo S-M, Kuo L-H, Chang C-S, Su I-J, et al. Mitochondrial fission contributes to mitochondrial dysfunction and insulin resistance in skeletal muscle. *Mol Cell Biol*. 2011/11/14 éd. janv 2012;32(2):309-19.
117. Dara L, Ji C, Kaplowitz N. THE CONTRIBUTION OF ER STRESS TO LIVER DISEASES. *Hepatology (Baltimore, Md)*. mai 2011;53(5):1752-63.
118. Kozutsumi Y, Segal M, Normington K, Gething M-J, Sambrook J. The presence of malfolded proteins in the endoplasmic reticulum signals the induction of glucose-regulated proteins. *Nature*. 1 mars 1988;332(6163):462-4.
119. Bertolotti A, Zhang Y, Hendershot LM, Harding HP, Ron D. Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nature Cell Biology*. 1 juin 2000;2(6):326-32.
120. Shen J, Chen X, Hendershot L, Prywes R. ER Stress Regulation of ATF6 Localization by Dissociation of BiP/GRP78 Binding and Unmasking of Golgi Localization Signals. *Developmental Cell*. 1 juill 2002;3(1):99-111.
121. Shi Y, Vattem KM, Sood R, An J, Liang J, Stramm L, et al. Identification and

characterization of pancreatic eukaryotic initiation factor 2 alpha-subunit kinase, PEK, involved in translational control. *Mol Cell Biol.* déc 1998;18(12):7499-509.

122. DuRose JB, Scheuner D, Kaufman RJ, Rothblum LI, Niwa M. Phosphorylation of eukaryotic translation initiation factor 2alpha coordinates rRNA transcription and translation inhibition during endoplasmic reticulum stress. *Mol Cell Biol.* 2009/05/26 éd. août 2009;29(15):4295-307.

123. Kaplowitz N, Ji C. Unfolding new mechanisms of alcoholic liver disease in the endoplasmic reticulum. *Journal of Gastroenterology and Hepatology.* 1 oct 2006;21(s3):S7-9.

124. Lee A-H, Iwakoshi NN, Glimcher LH. XBP-1 regulates a subset of endoplasmic reticulum resident chaperone genes in the unfolded protein response. *Mol Cell Biol.* nov 2003;23(21):7448-59.

125. Baiceanu A, Mesdom P, Lagouge M, Fougelle F. Endoplasmic reticulum proteostasis in hepatic steatosis. *Nat Rev Endocrinol.* déc 2016;12(12):710-22.

126. Zhang K, Kaufman RJ. From endoplasmic-reticulum stress to the inflammatory response. *Nature.* 24 juill 2008;454(7203):455-62.

127. Özcan U, Cao Q, Yilmaz E, Lee A-H, Iwakoshi NN, Özdelen E, et al. Endoplasmic Reticulum Stress Links Obesity, Insulin Action, and Type 2 Diabetes. *Science.* 15 oct 2004;306(5695):457.

128. Gregor MF, Yang L, Fabbrini E, Mohammed BS, Eagon JC, Hotamisligil GS, et al. Endoplasmic Reticulum Stress Is Reduced in Tissues of Obese Subjects After Weight Loss. *Diabetes.* 1 mars 2009;58(3):693.

129. Puri P, Mirshahi F, Cheung O, Natarajan R, Maher JW, Kellum JM, et al. Activation and Dysregulation of the Unfolded Protein Response in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology.* 1 févr 2008;134(2):568-76.

130. Lake AD, Novak P, Hardwick RN, Flores-Keown B, Zhao F, Klimecki WT, et al. The Adaptive Endoplasmic Reticulum Stress Response to Lipotoxicity in Progressive Human Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Toxicological Sciences.* 4 oct 2013;137(1):26-35.

131. Yoshiuchi K, Kaneto H, Matsuoka T, Kohno K, Iwawaki T, Nakatani Y, et al. Direct monitoring of in vivo ER stress during the development of insulin resistance with ER stress-activated indicator transgenic mice. *Biochemical and Biophysical Research*

Communications. 8 févr 2008;366(2):545-50.

132. Zhang K, Shen X, Wu J, Sakaki K, Saunders T, Rutkowski DT, et al. Endoplasmic Reticulum Stress Activates Cleavage of CREBH to Induce a Systemic Inflammatory Response. *Cell*. 10 févr 2006;124(3):587-99.

133. Lee M-W, Chanda D, Yang J, Oh H, Kim SS, Yoon Y-S, et al. Regulation of Hepatic Gluconeogenesis by an ER-Bound Transcription Factor, CREBH. *Cell Metabolism*. 7 avr 2010;11(4):331-9.

134. Hotamisligil GS. Endoplasmic reticulum stress and the inflammatory basis of metabolic disease. *Cell*. 19 mars 2010;140(6):900-17.

135. Fu S, Watkins SM, Hotamisligil GS. The Role of Endoplasmic Reticulum in Hepatic Lipid Homeostasis and Stress Signaling. *Cell Metabolism*. 2 mai 2012;15(5):623-34.

136. Trusina A, Papa FR, Tang C. Rationalizing translation attenuation in the network architecture of the unfolded protein response. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 23 déc 2008;105(51):20280-5.

137. Seo H-Y, Kim YD, Lee K-M, Min A-K, Kim M-K, Kim H-S, et al. Endoplasmic Reticulum Stress-Induced Activation of Activating Transcription Factor 6 Decreases Insulin Gene Expression via Up-Regulation of Orphan Nuclear Receptor Small Heterodimer Partner. *Endocrinology*. 1 août 2008;149(8):3832-41.

138. Nozaki J ichi, Kubota H, Yoshida H, Naitoh M, Goji J, Yoshinaga T, et al. The endoplasmic reticulum stress response is stimulated through the continuous activation of transcription factors ATF6 and XBP1 in Ins2+/Akita pancreatic beta cells. *Genes Cells*. mars 2004;9(3):261-70.

139. Lee A-H, Heidtman K, Hotamisligil GS, Glimcher LH. Dual and opposing roles of the unfolded protein response regulated by IRE1alpha and XBP1 in proinsulin processing and insulin secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 24 mai 2011;108(21):8885-90.

140. Odisho T, Zhang L, Volchuk A. ATF6 $\beta$  regulates the *Wfs1* gene and has a cell survival role in the ER stress response in pancreatic  $\beta$ -cells. *Experimental Cell Research*. 1 janv 2015;330(1):111-22.

141. Yamaguchi K, Takeda K, Kadowaki H, Ueda I, Namba Y, Ouchi Y, et al. Involvement of ASK1-p38 pathway in the pathogenesis of diabetes triggered by pancreatic  $\beta$  cell exhaustion. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. 1 juin

2013;1830(6):3656-63.

142. Lebeaupin C, Vallée D, Hazari Y, Hetz C, Chevet E, Bailly-Maitre B. Endoplasmic reticulum stress signalling and the pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of Hepatology*. 1 oct 2018;69(4):927-47.

143. Chan SMH, Sun R-Q, Zeng X-Y, Choong Z-H, Wang H, Watt MJ, et al. Activation of PPAR $\alpha$  Ameliorates Hepatic Insulin Resistance and Steatosis in High Fructose–Fed Mice Despite Increased Endoplasmic Reticulum Stress. *Diabetes*. 1 juin 2013;62(6):2095.

144. Ozcan U. Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science*. 2004;306.

145. Koh H-J, Toyoda T, Didesch MM, Lee M-Y, Sleeman MW, Kulkarni RN, et al. Tribbles 3 mediates endoplasmic reticulum stress-induced insulin resistance in skeletal muscle. *Nature Communications*. 21 mai 2013;4(1):1871.

146. Boden G, Duan X, Homko C, Molina EJ, Song W, Perez O, et al. Increase in Endoplasmic Reticulum Stress–Related Proteins and Genes in Adipose Tissue of Obese, Insulin-Resistant Individuals. *Diabetes*. 1 sept 2008;57(9):2438.

147. Kawasaki N, Asada R, Saito A, Kanemoto S, Imaizumi K. Obesity-induced endoplasmic reticulum stress causes chronic inflammation in adipose tissue. *Scientific Reports*. 12 nov 2012;2(1):799.

148. Jiao P, Ma J, Feng B, Zhang H, Alan-Diehl J, Eugene-Chin Y, et al. FFA-Induced Adipocyte Inflammation and Insulin Resistance: Involvement of ER Stress and IKK $\beta$  Pathways. *Obesity*. 1 mars 2011;19(3):483-91.

149. Perkins ND. Integrating cell-signalling pathways with NF- $\kappa$ B and IKK function. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 1 janv 2007;8(1):49-62.

150. Hu P, Han Z, Couvillon AD, Kaufman RJ, Exton JH. Autocrine tumor necrosis factor alpha links endoplasmic reticulum stress to the membrane death receptor pathway through IRE1 $\alpha$ -mediated NF- $\kappa$ B activation and down-regulation of TRAF2 expression. *Mol Cell Biol*. avr 2006;26(8):3071-84.

151. Zhang X, Zhang G, Zhang H, Karin M, Bai H, Cai D. Hypothalamic IKK $\beta$ /NF- $\kappa$ B and ER stress link overnutrition to energy imbalance and obesity. *Cell*. 3 oct 2008;135(1):61-73.

152. Hwang S-L, Li X, Lee J-Y, Chang HW. Improved insulin sensitivity by rapamycin is

associated with reduction of mTOR and S6K1 activities in L6 myotubes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 10 févr 2012;418(2):402-7.

153. Peng G, Li L, Liu Y, Pu J, Zhang S, Yu J, et al. Oleate Blocks Palmitate-Induced Abnormal Lipid Distribution, Endoplasmic Reticulum Expansion and Stress, and Insulin Resistance in Skeletal Muscle. *Endocrinology*. 1 juin 2011;152(6):2206-18.

154. Salvadó L, Coll T, Gómez-Foix AM, Salmerón E, Barroso E, Palomer X, et al. Oleate prevents saturated-fatty-acid-induced ER stress, inflammation and insulin resistance in skeletal muscle cells through an AMPK-dependent mechanism. *Diabetologia*. 1 juin 2013;56(6):1372-82.

155. Atkinson D, Small DM. RECOMBINANT LIPOPROTEINS: Implications for Structure and Assembly of Native Lipoproteins. *Annu Rev Biophys Biophys Chem*. 1 juin 1986;15(1):403-56.

156. Ren L, Yi J, Li W, Zheng X, Liu J, Wang J, et al. Apolipoproteins and cancer. *Cancer Med*. 2019/10/01 éd. nov 2019;8(16):7032-43.

157. Shen MM, Krauss RM, Lindgren FT, Forte TM. Heterogeneity of serum low density lipoproteins in normal human subjects. *Journal of Lipid Research*. 1 févr 1981;22(2):236-44.

158. Gardner CD, Fortmann SP, Krauss RM. Association of Small Low-Density Lipoprotein Particles With the Incidence of Coronary Artery Disease in Men and Women. *JAMA*. 18 sept 1996;276(11):875-81.

159. Fielding CJ, Fielding PE. Molecular physiology of reverse cholesterol transport. *Journal of Lipid Research*. 1 févr 1995;36(2):211-28.

160. Oram JF, Yokoyama S. Apolipoprotein-mediated removal of cellular cholesterol and phospholipids. *Journal of Lipid Research*. 1 déc 1996;37(12):2473-91.

161. Kunitake ST, La Sala KJ, Kane JP. Apolipoprotein A-I-containing lipoproteins with pre-beta electrophoretic mobility. *Journal of Lipid Research*. 1 mai 1985;26(5):549-55.

162. Ishida BY, Frolich J, Fielding CJ. Prebeta-migrating high density lipoprotein: quantitation in normal and hyperlipidemic plasma by solid phase radioimmunoassay following electrophoretic transfer. *Journal of Lipid Research*. 1 juill 1987;28(7):778-86.

163. Breslow JL. Apolipoprotein genes and atherosclerosis. *The clinical investigator*. 1 mai 1992;70(5):377-84.

164. Eisenberg S. High density lipoprotein metabolism. *Journal of Lipid Research*. 1 oct 1984;25(10):1017-58.
165. Cleaver J, Kraemer K. *The metabolic basis of inherited disease*. Scriver, CR, Beaudet AL, Sly, VS and Valle, D, Editors, McGraw-Hill, New York. 1989;2949-71.
166. Linton MF, Yancey PG, Davies SS, Jerome WG, Linton EF, Song WL, et al. The role of lipids and lipoproteins in atherosclerosis. 2019;
167. Kronenberg F. HDL in CKD—The Devil Is in the Detail. *J Am Soc Nephrol*. 1 mai 2018;29(5):1356.
168. Vekic J, Zeljkovic A, Stefanovic A, Jelic-Ivanovic Z, Spasojevic-Kalimanovska V. Obesity and dyslipidemia. *Metabolism*. 1 mars 2019;92:71-81.
169. Otvos JD, Mora S, Shalurova I, Greenland P, Mackey RH, Goff DC. Clinical implications of discordance between low-density lipoprotein cholesterol and particle number. *Journal of Clinical Lipidology*. 1 mars 2011;5(2):105-13.
170. Deeb SS, Zambon A, Carr MC, Ayyobi AF, Brunzell JD. Hepatic lipase and dyslipidemia: interactions among genetic variants, obesity, gender, and diet. *Journal of Lipid Research*. 1 juill 2003;44(7):1279-86.
171. Subramanian S, Chait A. Hypertriglyceridemia secondary to obesity and diabetes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*. 1 mai 2012;1821(5):819-25.
172. Simons LA, Dwyer T, Simons J, Bernstein L, Mock P, Pooma NS, et al. Chylomicrons and chylomicron remnants in coronary artery disease: a case-control study. *Atherosclerosis*. 1 mai 1987;65(1):181-9.
173. Karpe F, Steiner G, Uffelman K, Olivecrona T, Hamsten A. Postprandial lipoproteins and progression of coronary atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 1 mars 1994;106(1):83-97.
174. Ellsworth JL, Fong LG, Kraemer FB, Cooper AD. Differences in the processing of chylomicron remnants and beta-VLDL by macrophages. *Journal of Lipid Research*. 1 août 1990;31(8):1399-411.
175. Hokanson John E., Krauss Ronald M., Albers John J., Austin Melissa A., Brunzell John D. LDL Physical and Chemical Properties in Familial Combined Hyperlipidemia. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 1 avr 1995;15(4):452-9.

176. Helkin A, Stein JJ, Lin S, Siddiqui S, Maier KG, Gahtan V. Dyslipidemia Part 1— Review of Lipid Metabolism and Vascular Cell Physiology. *Vasc Endovascular Surg*. 1 févr 2016;50(2):107-18.
177. Schwartz EA, Reaven PD. Lipolysis of triglyceride-rich lipoproteins, vascular inflammation, and atherosclerosis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*. 1 mai 2012;1821(5):858-66.
178. Levy E, Ouadda ABD, Spahis S, Sane AT, Garofalo C, Grenier É, et al. PCSK9 plays a significant role in cholesterol homeostasis and lipid transport in intestinal epithelial cells. *Atherosclerosis*. 1 avr 2013;227(2):297-306.
179. Liu M-H. Antihyperlipidemic therapies targeting PCSK9: Novel therapeutic agents for lowering low-density lipoprotein cholesterol. *International Journal of Cardiology*. 15 sept 2015;195:212-4.
180. Kwon HJ, Lagace TA, McNutt MC, Horton JD, Deisenhofer J. Molecular basis for LDL receptor recognition by PCSK9. *Proc Natl Acad Sci USA*. 12 févr 2008;105(6):1820.
181. Varbo A, Benn M, Tybjaerg-Hansen A, Jørgensen AB, Frikke-Schmidt R, Nordestgaard BG. Remnant Cholesterol as a Causal Risk Factor for Ischemic Heart Disease. *Journal of the American College of Cardiology*. 29 janv 2013;61(4):427-36.
182. Guo Y-L, Zhang W, Li J-J. PCSK9 and lipid lowering drugs. *Clinica Chimica Acta*. 1 nov 2014;437:66-71.
183. Momtazi AA, Banach M, Pirro M, Katsiki N, Sahebkar A. Regulation of PCSK9 by nutraceuticals. *Pharmacol Res*. juin 2017;120:157-69.
184. Wagner WD, Edwards IJ, Clair RWSt, Barakat H. Low density lipoprotein interaction with artery derived proteoglycan: the influence of LDL particle size and the relationship to atherosclerosis susceptibility. *Atherosclerosis*. 1 janv 1989;75(1):49-59.
185. Anber V, Griffin BA, McConnell M, Packard CJ, Shepherd J. Influence of plasma lipid and LDL-subfraction profile on the interaction between low density lipoprotein with human arterial wall proteoglycans. *Atherosclerosis*. 2 août 1996;124(2):261-71.
186. Torzewski Michael, Suriyaphol Prapat, Paprotka Kerstin, Spath Lena, Ochsenhirt Viola, Schmitt Andrea, et al. Enzymatic Modification of Low-Density Lipoprotein in the Arterial Wall. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 1 nov 2004;24(11):2130-6.

187. Michael Torzewski, Karl J. Lackner. Initiation and progression of atherosclerosis – enzymatic or oxidative modification of low-density lipoprotein? *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*. 2006;44(12):1389-94.
188. Lund-Katz S, Laplaud PM, Phillips MC, Chapman MJ. Apolipoprotein B-100 Conformation and Particle Surface Charge in Human LDL Subspecies: Implication for LDL Receptor Interaction. *Biochemistry*. 1 sept 1998;37(37):12867-74.
189. Chen GC, Liu W, Duchateau P, Allaart J, Hamilton RL, Mendel CM, et al. Conformational differences in human apolipoprotein B-100 among subspecies of low density lipoproteins (LDL). Association of altered proteolytic accessibility with decreased receptor binding of LDL subspecies from hypertriglyceridemic subjects. *Journal of Biological Chemistry*. 18 nov 1994;269(46):29121-8.
190. Rogacev KS, Cremers B, Zawada AM, Seiler S, Binder N, Ege P, et al. CD14++CD16+ Monocytes Independently Predict Cardiovascular Events: A Cohort Study of 951 Patients Referred for Elective Coronary Angiography. *Journal of the American College of Cardiology*. 16 oct 2012;60(16):1512-20.
191. Brown MS, Goldstein JL, Krieger M, Ho YK, Anderson RG. Reversible accumulation of cholesteryl esters in macrophages incubated with acetylated lipoproteins. *J Cell Biol*. sept 1979;82(3):597-613.
192. Fujioka Y, Cooper AD, Fong LG. Multiple processes are involved in the uptake of chylomicron remnants by mouse peritoneal macrophages. *Journal of Lipid Research*. 1 déc 1998;39(12):2339-49.
193. Moore Kathryn J., Freeman Mason W. Scavenger Receptors in Atherosclerosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 1 août 2006;26(8):1702-11.
194. VIRMANI R, BURKE AP, KOLODIE FD, FARB A. Vulnerable Plaque: The Pathology of Unstable Coronary Lesions. *Journal of Interventional Cardiology*. 1 déc 2002;15(6):439-46.
195. Libby P. Mechanisms of Acute Coronary Syndromes and Their Implications for Therapy. *N Engl J Med*. 22 mai 2013;368(21):2004-13.
196. Moore KJ, Sheedy FJ, Fisher EA. Macrophages in atherosclerosis: a dynamic balance. *Nature Reviews Immunology*. 1 oct 2013;13(10):709-21.
197. Miller NE. Associations of high-density lipoprotein subclasses and apolipoproteins

with ischemic heart disease and coronary atherosclerosis. *American Heart Journal*. 1 févr 1987;113(2, Part 2):589-97.

198. Phillips MC. New insights into the determination of HDL structure by apolipoproteins: Thematic Review Series: High Density Lipoprotein Structure, Function, and Metabolism. *Journal of Lipid Research*. 1 août 2013;54(8):2034-48.

199. Rosenson RS, Brewer HB, Davidson WS, Fayad ZA, Fuster V, Goldstein J, et al. Cholesterol efflux and atheroprotection: Advancing the concept of reverse cholesterol transport. *Circulation*. 2014;125(15):1905-19.

200. Favari E, Tietge U, Zanotti I, Escolà-Gil J, Bernini F. Cholesterol efflux and reverse cholesterol transport. In: *High density lipoproteins Handbook of Experimental Pharmacology*. Springer. 2015. (Cham; vol. 224).

201. Phillips MC. Molecular mechanisms of cellular cholesterol efflux. *J Biol Chem*. 2014/07/29 éd. 29 août 2014;289(35):24020-9.

202. Rader DJ, Alexander ET, Weibel GL, Billheimer J, Rothblat GH. The role of reverse cholesterol transport in animals and humans and relationship to atherosclerosis. *Journal of Lipid Research*. 2009;50(Suppl):S189-94.

203. Adomi MP, Zimetti F, Billheimer JT, Wang N, Rader DJ, Phillips MC, et al. The roles of different pathways in the release of cholesterol from macrophages. *Journal of Lipid Research*. 1 nov 2007;48(11):2453-62.

204. Yvan-Charvet L, Ranalletta M, Wang N, Han S, Terasaka N, Li R, et al. Combined deficiency of ABCA1 and ABCG1 promotes foam cell accumulation and accelerates atherosclerosis in mice. *J Clin Invest*. 3 déc 2007;117(12):3900-8.

205. Ouimet M, Barrett TJ, Fisher EA. HDL and Reverse Cholesterol Transport. Basic Mechanisms and their roles in vascular health and disease. *Circulation Research*. 2019;124:1505-18.

206. Dawson PA. Role of the intestinal bile acid transporters in bile acid and drug disposition. *Handb Exp Pharmacol*. 2011;(201):169-203.

207. Bosner MS, Lange LG, Stenson WF, Ostlund REJ. Percent cholesterol absorption in normal women and men quantified with dual stable isotopic tracers and negative ion mass spectrometry. *J Lipid Res*. févr 1999;40(2):302-8.

208. Simmonds WJ, Hofmann AF, Theodor E. Absorption of cholesterol from a micellar solution: intestinal perfusion studies in man. *J Clin Invest.* mai 1967;46(5):874-90.
209. de Boer JF, Kuipers F, Groen AK. Cholesterol Transport Revisited: A New Turbo Mechanism to Drive Cholesterol Excretion. *Trends Endocrinol Metab.* févr 2018;29(2):123-33.
210. Grefhorst A, Verkade HJ, Groen AK. The TICE Pathway: Mechanisms and Lipid-Lowering Therapies. *Methodist Debaquey Cardiovasc J.* 2019;15(1):70-6.
211. Koliaki C, Liatis S, Kokkinos A. Obesity and cardiovascular disease: revisiting an old relationship. *Metabolism.* 1 mars 2019;92:98-107.
212. Gancheva S, Jelenik T, Álvarez-Hernández E, Roden M. Interorgan Metabolic Crosstalk in Human Insulin Resistance. *Physiological Reviews.* 16 mai 2018;98(3):1371-415.
213. Apovian CM, Bigornia S, Mott M, Meyers MR, Ulloor J, Gagua M, et al. Adipose macrophage infiltration is associated with insulin resistance and vascular endothelial dysfunction in obese subjects. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology.* 2009;28(9):1654-9.
214. Jiang C, Qu A, Matsubara T, Chanturiya T, Jou W, Gavrilova O, et al. Disruption of Hypoxia-Inducible Factor 1 in Adipocytes Improves Insulin Sensitivity and Decreases Adiposity in High-Fat Diet–Fed Mice. *Diabetes.* 1 oct 2011;60(10):2484.
215. Henegar C, Tordjman J, Achard V, Lacasa D, Cremer I, Guerre-Millo M, et al. Adipose tissue transcriptomic signature highlights the pathological relevance of extracellular matrix in human obesity. *Genome Biology.* 21 janv 2008;9(1):R14.
216. Skurk T, Alberti-Huber C, Herder C, Hauner H. Relationship between Adipocyte Size and Adipokine Expression and Secretion. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism.* 1 mars 2007;92(3):1023-33.
217. Heinonen S, Buzkova J, Muniandy M, Kaksonen R, Ollikainen M, Ismail K, et al. Impaired Mitochondrial Biogenesis in Adipose Tissue in Acquired Obesity. *Diabetes.* 1 sept 2015;64(9):3135.
218. Costa RM, Neves KB, Tostes RC, Lobato NS. Perivascular Adipose Tissue as a Relevant Fat Depot for Cardiovascular Risk in Obesity. *Frontiers in Physiology.* 2018;9:253.

219. Schetz M, De Jong A, Deane AM, Druml W, Hemelaar P, Pelosi P, et al. Obesity in the critically ill: a narrative review. *Intensive Care Medicine*. 1 juin 2019;45(6):757-69.
220. Calle EE, Thun MJ. Obesity and cancer. *Oncogene*. 23(38):6365-78.
221. Meex RCR, Watt MJ. Hepatokines: linking nonalcoholic fatty liver disease and insulin resistance. *Nature Reviews Endocrinology*. 1 sept 2017;13(9):509-20.
222. Hashimoto E, Taniai M, Tokushige K. Characteristics and diagnosis of NAFLD/NASH. *J Gastroenterol Hepatol*. 1 déc 2013;28:64-70.
223. Than NN, Newsome PN. A concise review of non-alcoholic fatty liver disease. *Atherosclerosis*. 239(1):192-202.
224. Younossi ZM, Koenig AB, Abdelatif D, Fazel Y, Henry L, Wymer M. Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease—Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology*. 1 juill 2016;64(1):73-84.
225. Leite NC, Salles GF, Araujo ALE, Villela-Nogueira CA, Cardoso CRL. Prevalence and associated factors of non-alcoholic fatty liver disease in patients with type-2 diabetes mellitus. *Liver International*. 1 janv 2009;29(1):113-9.
226. Wicklow BA, Wittmeier KD, MacIntosh AC, Sellers EA, Ryner L, Serrai H, et al. Metabolic Consequences of Hepatic Steatosis in Overweight and Obese Adolescents. *Diabetes Care*. avr 2012;35(4):905-10.
227. Friedman SL, Neuschwander-Tetri BA, Rinella M, Sanyal AJ. Mechanisms of NAFLD development and therapeutic strategies. *Nature Medicine*. 1 juill 2018;24(7):908-22.
228. Buzzetti E, Pinzani M, Tsochatzis EA. The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Metabolism - Clinical and Experimental*. 1 août 2016;65(8):1038-48.
229. Benedict M, Zhang X. Non-alcoholic fatty liver disease: An expanded review. *World Journal of Hepatology*. 8 juin 2017;9(16):715-32.
230. Perry RJ, Samuel VT, Petersen KF, Shulman GI. The role of hepatic lipids in hepatic insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature*. 1 juin 2014;510(7503):84-91.
231. Mauer AS, Hirsova P, Maiers JL, Shah VH, Malhi H. Inhibition of sphingosine 1-phosphate signaling ameliorates murine nonalcoholic steatohepatitis. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. 30 déc 2016;312(3):G300-13.

232. Hirsova P, Ibrabim SH, Gores GJ, Malhi H. Lipotoxic lethal and sublethal stress signaling in hepatocytes: relevance to NASH pathogenesis. *Journal of Lipid Research*. 1 oct 2016;57(10):1758-70.
233. Han MS, Park SY, Shinzawa K, Kim S, Chung KW, Lee J-H, et al. Lysophosphatidylcholine as a death effector in the lipoapoptosis of hepatocytes. *Journal of Lipid Research*. 1 janv 2008;49(1):84-97.
234. Ioannou GN. The Role of Cholesterol in the Pathogenesis of NASH. *Trends in Endocrinology & Metabolism*. 1 févr 2016;27(2):84-95.
235. Van Rooyen DM, Larter CZ, Haigh WG, Yeh MM, Ioannou G, Kuver R, et al. Hepatic Free Cholesterol Accumulates in Obese, Diabetic Mice and Causes Nonalcoholic Steatohepatitis. *Gastroenterology*. 1 oct 2011;141(4):1393-1403.e5.
236. Bradbury MW. Lipid Metabolism and Liver Inflammation. I. Hepatic fatty acid uptake: possible role in steatosis. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. 1 févr 2006;290(2):G194-8.
237. Koo S-H. Nonalcoholic fatty liver disease: molecular mechanisms for the hepatic steatosis. *Clin Mol Hepatol*. 2013/09/30 éd. sept 2013;19(3):210-5.
238. Stremmel W, Staffer S, Wannhoff A, Pathil A, Chamulitrat W. Plasma membrane phospholipase A2 controls hepatocellular fatty acid uptake and is responsive to pharmacological modulation: implications for nonalcoholic steatohepatitis. *The FASEB Journal*. 9 avr 2014;28(7):3159-70.
239. Nielsen S, Guo Z, Johnson CM, Hensrud DD, Jensen MD. Splanchnic lipolysis in human obesity. *J Clin Invest*. juin 2004;113(11):1582-8.
240. Fabbrini E, Magkos F. Hepatic Steatosis as a Marker of Metabolic Dysfunction. *Nutrients*. 19 juin 2015;7(6):4995-5019.
241. Mittendorfer B, Magkos F, Fabbrini E, Mohammed BS, Klein S. Relationship Between Body Fat Mass and Free Fatty Acid Kinetics in Men and Women. *Obesity*. 1 oct 2009;17(10):1872-7.
242. Fabbrini E, Mohammed BS, Magkos F, Korenblat KM, Patterson BW, Klein S. Alterations in Adipose Tissue and Hepatic Lipid Kinetics in Obese Men and Women With Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology*. 1 févr 2008;134(2):424-31.

243. Fabbrini E, Magkos F, Mohammed BS, Pietka T, Abumrad NA, Patterson BW, et al. Intrahepatic fat, not visceral fat, is linked with metabolic complications of obesity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 8 sept 2009;106(36):15430.
244. Sunny NE, Parks EJ, Browning JD, Burgess SC. Excessive hepatic mitochondrial TCA cycle and gluconeogenesis in humans with nonalcoholic fatty liver disease. *Cell Metab*. 7 déc 2011;14(6):804-10.
245. Korenblat KM, Fabbrini E, Mohammed BS, Klein S. Liver, Muscle, and Adipose Tissue Insulin Action Is Directly Related to Intrahepatic Triglyceride Content in Obese Subjects. *Gastroenterology*. 1 mai 2008;134(5):1369-75.
246. Armstrong MJ, Hazlehurst JM, Hull D, Guo K, Borrows S, Yu J, et al. Abdominal subcutaneous adipose tissue insulin resistance and lipolysis in patients with non-alcoholic steatohepatitis. *Diabetes Obes Metab*. 2014/03/11 éd. juill 2014;16(7):651-60.
247. Pardina E, Baena-Fustegueras JA, Catalán R, Galard R, Lecube A, Fort JM, et al. Increased Expression and Activity of Hepatic Lipase in the Liver of Morbidly Obese Adult Patients in Relation to Lipid Content. *Obesity Surgery*. 1 juill 2009;19(7):894-904.
248. Westerbacka J, Kolak M, Kiviluoto T, Arkkila P, Sirén J, Hamsten A, et al. Genes Involved in Fatty Acid Partitioning and Binding, Lipolysis, Monocyte/Macrophage Recruitment, and Inflammation Are Overexpressed in the Human Fatty Liver of Insulin-Resistant Subjects. *Diabetes*. 1 nov 2007;56(11):2759.
249. Greco D, Kotronen A, Westerbacka J, Puig O, Arkkila P, Kiviluoto T, et al. Gene expression in human NAFLD. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. 1 mai 2008;294(5):G1281-7.
250. Auguet T, Berlanga A, Guiu-Jurado E, Martinez S, Porrás JA, Aragonès G, et al. Altered fatty acid metabolism-related gene expression in liver from morbidly obese women with non-alcoholic fatty liver disease. *Int J Mol Sci*. 2 déc 2014;15(12):22173-87.
251. Donnelly KL, Smith CI, Schwarzenberg SJ, Jessurun J, Boldt MD, Parks EJ. Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Invest*. 2 mai 2005;115(5):1343-51.
252. Petersen KF, Dufour S, Savage DB, Bilz S, Solomon G, Yonemitsu S, et al. The role of skeletal muscle insulin resistance in the pathogenesis of the metabolic syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA*. 31 juill 2007;104(31):12587.

253. Caliceti C, Calabria D, Roda A, Cicero AFG. Fructose Intake, Serum Uric Acid, and Cardiometabolic Disorders: A Critical Review. *Nutrients*. 18 avr 2017;9(4):395.
254. Jegatheesan P, De Bandt J-P. Fructose and NAFLD: The Multifaceted Aspects of Fructose Metabolism. *Nutrients*. 3 mars 2017;9(3):230.
255. Ishimoto T, Lanaspa MA, Le MT, Garcia GE, Diggle CP, Maclean PS, et al. Opposing effects of fructokinase C and A isoforms on fructose-induced metabolic syndrome in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012/02/27 éd. 13 mars 2012;109(11):4320-5.
256. Ishimoto T, Lanaspa MA, Rivard CJ, Roncal-Jimenez CA, Orlicky DJ, Cicerchi C, et al. High-fat and high-sucrose (western) diet induces steatohepatitis that is dependent on fructokinase. *Hepatology*. 2013/10/08 éd. nov 2013;58(5):1632-43.
257. Zhang D, Tong X, VanDommelen K, Gupta N, Stamper K, Brady GF, et al. Lipogenic transcription factor ChREBP mediates fructose-induced metabolic adaptations to prevent hepatotoxicity. *J Clin Invest*. 2017/06/19 éd. 30 juin 2017;127(7):2855-67.
258. Jang C, Hui S, Lu W, Cowan AJ, Morscher RJ, Lee G, et al. The Small Intestine Converts Dietary Fructose into Glucose and Organic Acids. *Cell Metabolism*. 6 févr 2018;27(2):351-361.e3.
259. Wanders RJA, Komen J, Kemp S. Fatty acid omega-oxidation as a rescue pathway for fatty acid oxidation disorders in humans. *The FEBS Journal*. 1 janv 2011;278(2):182-94.
260. McGarry JD, Woeltje KF, Kuwajima M, Foster DW. Regulation of ketogenesis and the renaissance of carnitine palmitoyltransferase. *Diabetes/Metabolism Reviews*. 1 mai 1989;5(3):271-84.
261. McGarry JD, Foster DW. Regulation of Hepatic Fatty Acid Oxidation and Ketone Body Production. *Annu Rev Biochem*. 1 juin 1980;49(1):395-420.
262. Nakamuta M, Kohjima M, Morizono S, Kotoh K, Yoshimoto T, Miyagi I, et al. Evaluation of fatty acid metabolism-related gene expression in nonalcoholic fatty liver disease. *International journal of molecular medicine*. 2005;16(4):631-5.
263. Kohjima M, Enjoji M, Higuchi N, Kato M, Kotoh K, Yoshimoto T, et al. Re-evaluation of fatty acid metabolism-related gene expression in nonalcoholic fatty liver disease. *International journal of molecular medicine*. 2007;20(3):351-8.

264. Kotronen A, Seppälä-Lindroos A, Vehkavaara S, Bergholm R, Frayn KN, Fielding BA, et al. Liver fat and lipid oxidation in humans. *Liver International*. 1 oct 2009;29(9):1439-46.
265. Chalasani N, Gorski JC, Asghar MS, Asghar A, Foresman B, Hall SD, et al. Hepatic cytochrome P450 2E1 activity in nondiabetic patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*. 1 mars 2003;37(3):544-50.
266. Sanyal AJ, Campbell-Sargent C, Mirshahi F, Rizzo WB, Contos MJ, Sterling RK, et al. Nonalcoholic steatohepatitis: Association of insulin resistance and mitochondrial abnormalities. *Gastroenterology*. 1 avr 2001;120(5):1183-92.
267. Caldwell SH, Swerdlow RH, Khan EM, Iezzoni JC, Hespenheide EE, Parks JK, et al. Mitochondrial abnormalities in non-alcoholic steatohepatitis. *Journal of Hepatology*. 1 sept 1999;31(3):430-4.
268. Pérez-Carreras M, Del Hoyo P, Martín MA, Rubio JC, Martín A, Castellano G, et al. Defective hepatic mitochondrial respiratory chain in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*. 1 oct 2003;38(4):999-1007.
269. Cortez-Pinto H, Chatham J, Chacko VP, Arnold C, Rashid A, Diehl AM. Alterations in Liver ATP Homeostasis in Human Nonalcoholic Steatohepatitis: A Pilot Study. *JAMA*. 3 nov 1999;282(17):1659-64.
270. Pessayre D, Fromenty B. NASH: a mitochondrial disease. *Journal of Hepatology*. 1 juin 2005;42(6):928-40.
271. Gudson AM, Song K, Qu S. Nonalcoholic fatty liver disease: pathogenesis and therapeutics from a mitochondria-centric perspective. 2014;2014(637027).
272. Moreno-Fernandez ME, Giles DA, Stankiewicz TE, Sheridan R, Karns R, Cappelletti M, et al. Peroxisomal  $\beta$ -oxidation regulates whole body metabolism, inflammatory vigor, and pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. *JCI Insight*. 22 mars 2018;3(6):e93626.
273. Elovson J, Chatterton JE, Bell GT, Schumaker VN, Reuben MA, Puppione DL, et al. Plasma very low density lipoproteins contain a single molecule of apolipoprotein B. *Journal of Lipid Research*. 1 nov 1988;29(11):1461-73.
274. Chan Dick C., Watts Gerald F., Gan SengKhee, Wong Annette T.Y., Ooi Esther M.M., Barrett P. Hugh R. Nonalcoholic Fatty Liver Disease as the Transducer of Hepatic Oversecretion of Very-Low-Density Lipoprotein–Apolipoprotein B-100 in Obesity.

- Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology. 1 mai 2010;30(5):1043-50.
275. Horton JD, Shimano H, Hamilton RL, Brown MS, Goldstein JL. Disruption of LDL receptor gene in transgenic SREBP-1a mice unmasks hyperlipidemia resulting from production of lipid-rich VLDL. *J Clin Invest.* 1 avr 1999;103(7):1067-76.
276. Fabbrini E, Tiemann Luecking C, Love-Gregory L, Okunade AL, Yoshino M, Fraterrigo G, et al. Physiological Mechanisms of Weight Gain-Induced Steatosis in People With Obesity. *Gastroenterology.* 1 janv 2016;150(1):79-81.e2.
277. Watt MJ, Miotto PM, De Nardo W, Montgomery MK. The Liver as an Endocrine Organ—Linking NAFLD and Insulin Resistance. *Endocrine Reviews.* 25 avr 2019;40(5):1367-93.
278. Nuño-Lámbarri N, Domínguez-Pérez M, Baulies-Domenech A, Monte MJ, Marin JJG, Rosales-Cruz P, et al. Liver Cholesterol Overload Aggravates Obstructive Cholestasis by Inducing Oxidative Stress and Premature Death in Mice. *Jadeja R, éditeur. Oxidative Medicine and Cellular Longevity.* 21 août 2016;2016:9895176.
279. Brown MS, Goldstein JL. The SREBP Pathway: Regulation of Cholesterol Metabolism by Proteolysis of a Membrane-Bound Transcription Factor. *Cell.* 2 mai 1997;89(3):331-40.
280. Browning JD, Horton JD. Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. *J Clin Invest.* 15 juill 2004;114(2):147-52.
281. Tomita K, Teratani T, Suzuki T, Shimizu M, Sato H, Narimatsu K, et al. Free cholesterol accumulation in hepatic stellate cells: Mechanism of liver fibrosis aggravation in nonalcoholic steatohepatitis in mice. *Hepatology.* 1 janv 2014;59(1):154-69.
282. Marí M, Caballero F, Colell A, Morales A, Caballeria J, Fernandez A, et al. Mitochondrial free cholesterol loading sensitizes to TNF- and Fas-mediated steatohepatitis. *Cell Metabolism.* 1 sept 2006;4(3):185-98.
283. Wouters K, van Bilsen M, van Gorp PJ, Bieghs V, Lütjohann D, Kerksiek A, et al. Intrahepatic cholesterol influences progression, inhibition and reversal of non-alcoholic steatohepatitis in hyperlipidemic mice. *FEBS Letters.* 5 mars 2010;584(5):1001-5.
284. Caussy C, Hsu C, Singh S, Bassirian S, Kolar J, Faulkner C, et al. Serum bile acid patterns are associated with the presence of NAFLD in twins, and dose-dependent changes with increase in fibrosis stage in patients with biopsy-proven NAFLD. *Alimentary*

Pharmacology and Therapeutics. 2019;49(2):183-93.

285. Lu LP, Wan YP, Xun PC, Zhou KJ, Chen C, Cheng SY, et al. Serum bile acid level and fatty acid composition in Chinese children with non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of Digestive Diseases*. août 2017;18(8):461-71.

286. Puri P, Daita K, Joyce A, Mirshahi F, Santhekadur PK, Cazanave S, et al. The presence and severity of nonalcoholic steatohepatitis is associated with specific changes in circulating bile acids. *Hepatology*. 2018;67(2):534-48.

287. Legry V, Francque S, Haas JT, Verrijken A, Caron S, Chávez-Talavera O, et al. Bile Acid Alterations Are Associated With Insulin Resistance, but Not With NASH, in Obese Subjects. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 4 août 2017;102(10):3783-94.

288. Skotland T, Sandvig K, Llorente A. Lipids in exosomes: Current knowledge and the way forward. *Progress in Lipid Research*. 1 avr 2017;66:30-41.

289. Dang VD, Jella KK, Ragheb RRT, Denslow ND, Alli AA. Lipidomic and proteomic analysis of exosomes from mouse cortical collecting duct cells. *The FASEB Journal*. 16 août 2017;31(12):5399-408.

290. Llorente A, Skotland T, Sylvänne T, Kauhanen D, Róg T, Orłowski A, et al. Molecular lipidomics of exosomes released by PC-3 prostate cancer cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*. 1 juill 2013;1831(7):1302-9.

291. Chiang JYL, Ferrell JM. Bile Acid Metabolism in Liver Pathobiology. *Gene Expr*. 2018/01/11 éd. 18 mai 2018;18(2):71-87.

292. Samuel VT, Shulman GI. The pathogenesis of insulin resistance: integrating signaling pathways and substrate flux. *J Clin Invest*. 4 janv 2016;126(1):12-22.

293. Gault CR, Obeid LM, Hannun YA. An overview of sphingolipid metabolism: from synthesis to breakdown. In: *Sphingolipids as signaling and regulatory molecules*. Chalfant Charles and Del Poeta Maurizio. 2010. (Advances in experimental medicine and biology; vol. 688).

294. Chavez JA, Summers SA. A Ceramide-Centric View of Insulin Resistance. *Cell Metabolism*. 2 mai 2012;15(5):585-94.

295. Reali F, Morine MJ, Kahramanoğulları O, Raichur S, Schneider H-C, Crowther D, et

al. Mechanistic interplay between ceramide and insulin resistance. *Scientific Reports*. 23 janv 2017;7(1):41231.

296. Correnti JM, Juskeviciute E, Swarup A, Hoek JB. Pharmacological ceramide reduction alleviates alcohol-induced steatosis and hepatomegaly in adiponectin knockout mice. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. 17 avr 2014;306(11):G959-73.

297. Fucho R, Casals N, Serra D, Herrero L. Ceramides and mitochondrial fatty acid oxidation in obesity. *The FASEB Journal*. 21 déc 2016;31(4):1263-72.

298. Cai D, Yuan M, Frantz DF, Melendez PA, Hansen L, Lee J, et al. Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK- $\beta$  and NF- $\kappa$ B. *Nature medicine*. févr 2005;11(2):183-90.

299. Alisi A, Carpino G, Oliveira FL, Panera N, Nobili V, Gaudio E. The Role of Tissue Macrophage-Mediated Inflammation on NAFLD Pathogenesis and Its Clinical Implications. *Mediators of Inflammation*. 2017;2017:8162421.

300. Schaefer L. Complexity of Danger: The Diverse Nature of Damage-associated Molecular Patterns. *The Journal of Biological Chemistry*. 19 déc 2014;289(51):35237-45.

301. An P, Wei L-L, Zhao S, Sverdlov DY, Vaid KA, Miyamoto M, et al. Hepatocyte mitochondria-derived danger signals directly activate hepatic stellate cells and drive progression of liver fibrosis. *Nature Communications*. 12 mai 2020;11(1):2362.

302. Szabo G, Csak T. Inflammasomes in liver diseases. *Journal of Hepatology*. 1 sept 2012;57(3):642-54.

303. Tanwar S, Rhodes F, Srivastava A, Trembling PM, Rosenberg WM. Inflammation and fibrosis in chronic liver diseases including non-alcoholic fatty liver disease and hepatitis C. *World Journal Gastroenterology*. 2020;26(2):109-33.

304. Deng J, Lu PD, Zhang Y, Scheuner D, Kaufman RJ, Sonenberg N, et al. Translational Repression Mediates Activation of Nuclear Factor Kappa B by Phosphorylated Translation Initiation Factor 2. *Mol Cell Biol*. 1 déc 2004;24(23):10161.

305. Wu S, Tan M, Hu Y, Wang J-L, Scheuner D, Kaufman RJ. Ultraviolet Light Activates NF $\kappa$ B through Translational Inhibition of I $\kappa$ B $\alpha$  Synthesis. *Journal of Biological Chemistry*. 13 août 2004;279(33):34898-902.

306. Urano F, Wang X, Bertolotti A, Zhang Y, Chung P, Harding HP, et al. Coupling of Stress in the ER to Activation of JNK Protein Kinases by Transmembrane Protein Kinase IRE1. *Science*. 28 janv 2000;287(5453):664.
307. Meli R, Mattace Raso G, Calignano A. Role of Innate Immune Response in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: Metabolic Complications and Therapeutic Tools. *Frontiers in Immunology*. 2014;5:177.
308. Ganz M, Szabo G. Immune and inflammatory pathways in NASH. *Hepatology International*. 1 déc 2013;7(2):771-81.
309. Kono H, Rock KL. How dying cells alert the immune system to danger. *Nature Reviews Immunology*. 1 avr 2008;8(4):279-89.
310. Xu R, Huang H, Zhang Z, Wang F-S. The role of neutrophils in the development of liver diseases. *Cellular & Molecular Immunology*. 1 mai 2014;11(3):224-31.
311. Arrese M, Cabrera D, Kalergis AM, Feldstein AE. Innate immunity and inflammation in NAFLD/NASH. *Digestive diseases and sciences*. mai 2016;61(5):1294-303.
312. Geissmann F, Manz MG, Jung S, Sieweke MH, Merad M, Ley K. Development of Monocytes, Macrophages, and Dendritic Cells. *Science*. 5 févr 2010;327(5966):656.
313. Dal-Secco D, Wang J, Zeng Z, Kolaczowska E, Wong CHY, Petri B, et al. A dynamic spectrum of monocytes arising from the in situ reprogramming of CCR2+ monocytes at a site of sterile injury. *Journal of Experimental Medicine*. 23 mars 2015;212(4):447-56.
314. Italiani P, Boraschi D. From Monocytes to M1/M2 Macrophages: Phenotypical vs. Functional Differentiation. *Frontiers in Immunology*. 2014;5:514.
315. Rossaint J, Zarbock A. Platelets in leucocyte recruitment and function. *Cardiovascular Research*. 24 févr 2015;107(3):386-95.
316. Radaeva S, Sun R, Jaruga B, Nguyen VT, Tian Z, Gao B. Natural Killer Cells Ameliorate Liver Fibrosis by Killing Activated Stellate Cells in NKG2D-Dependent and Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand-Dependent Manners. *Gastroenterology*. 1 févr 2006;130(2):435-52.
317. Romagnani S. Type 1 T helper and type 2 T helper cells: Functions, regulation and role in protection and disease. *International Journal of Clinical and Laboratory Research*. 1 juin 1992;21(2):152-8.

318. Sun HQ, Zhang JY, Zhang H, Zou ZS, Wang FS, Jia JH. Increased Th17 cells contribute to disease progression in patients with HBV-associated liver cirrhosis. *Journal of Viral Hepatitis*. 1 juin 2012;19(6):396-403.
319. Ouyang W, Kolls JK, Zheng Y. The Biological Functions of T Helper 17 Cell Effector Cytokines in Inflammation. *Immunity*. 11 avr 2008;28(4):454-67.
320. Fernandes-Alnemri T, Yu J-W, Datta P, Wu J, Alnemri ES. AIM2 activates the inflammasome and cell death in response to cytoplasmic DNA. *Nature*. 1 mars 2009;458(7237):509-13.
321. Chan FK-M, Luz NF, Moriwaki K. Programmed Necrosis in the Cross Talk of Cell Death and Inflammation. *Annu Rev Immunol*. 21 mars 2015;33(1):79-106.
322. Borkham-Kamphorst E, van Roeyen CRC, Ostendorf T, Floege J, Gressner AM, Weiskirchen R. Pro-fibrogenic potential of PDGF-D in liver fibrosis. *Journal of Hepatology*. 1 juin 2007;46(6):1064-74.
323. Hernandez-Gea V, Friedman SL. Pathogenesis of Liver Fibrosis. *Annu Rev Pathol Mech Dis*. 24 janv 2011;6(1):425-56.
324. Nobili V, Parola M, Alisi A, Marra F, Piemonte F, Mombello C, et al. Oxidative stress parameters in paediatric non-alcoholic fatty liver disease. *International journal of molecular medicine*. 2010;26(4):471-6.
325. Thabut D, Routray C, Lomberk G, Shergill U, Glaser K, Huebert R, et al. Complementary vascular and matrix regulatory pathways underlie the beneficial mechanism of action of sorafenib in liver fibrosis. *Hepatology*. 2011;54(2):573-85.
326. Knittel T, Mehde M, Kobold D, Saile B, Dinter C, Ramadori G. Expression patterns of matrix metalloproteinases and their inhibitors in parenchymal and non-parenchymal cells of rat liver: regulation by TNF- $\alpha$  and TGF- $\beta$ 1. *Journal of Hepatology*. 1 janv 1999;30(1):48-60.
327. Bourd-Boittin K, Bonnier D, Leyme A, Mari B, Tuffery P, Samson M, et al. Protease profiling of liver fibrosis reveals the ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif, A as a central activator of transforming growth factor beta. *Hepatology*. 2011;54(6):2173-84.
328. Cleveland E, Bandy A, VanWagner LB. Diagnostic challenges of nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis. *Clinical Liver Disease*. 1 avr 2018;11(4):98-104.

329. Chalasani N, Younossi Z, Lavine JE, Charlton M, Cusi K, Rinella M, et al. The diagnosis and management of nonalcoholic fatty liver disease: Practice guidance from the American Association for the Study of Liver Diseases. *Hepatology*. 1 janv 2018;67(1):328-57.
330. Saadeh S, Younossi ZM, Remer EM, Gramlich T, Ong JP, Hurley M, et al. The utility of radiological imaging in nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology*. 1 sept 2002;123(3):745-50.
331. Khov N, Sharma A, Riley TR. Bedside ultrasound in the diagnosis of nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol*. 14 juin 2014;20(22):6821-5.
332. Ducluzeau P-H, Boursier J, Bertrais S, Dubois S, Gauthier A, Rohmer V, et al. MRI measurement of liver fat content predicts the metabolic syndrome. *Diabetes & Metabolism*. 1 sept 2013;39(4):314-21.
333. Dulai PS, Sirlin CB, Loomba R. MRI and MRE for non-invasive quantitative assessment of hepatic steatosis and fibrosis in NAFLD and NASH: Clinical trials to clinical practice. *Journal of Hepatology*. 1 nov 2016;65(5):1006-16.
334. Younossi ZM, Loomba R, Anstee QM, Rinella ME, Bugianesi E, Marchesini G, et al. Diagnostic modalities for nonalcoholic fatty liver disease, nonalcoholic steatohepatitis, and associated fibrosis. *Hepatology*. 1 juill 2018;68(1):349-60.
335. Verma S, Jensen D, Hart J, Mohanty SR. Predictive value of ALT levels for non-alcoholic steatohepatitis (NASH) and advanced fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Liver International*. 1 oct 2013;33(9):1398-405.
336. Jayakumar S, Harrison SA, Loomba R. Noninvasive Markers of Fibrosis and Inflammation in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Curr Hepatol Rep*. 2016/04/21 éd. juin 2016;15(2):86-95.
337. Sharma P, Arora A. Clinical presentation of alcoholic liver disease and non-alcoholic fatty liver disease: spectrum and diagnosis. *Transl Gastroenterol Hepatol*. 5 avr 2020;5:19-19.
338. Ong JP, Pitts A, Younossi ZM. Increased overall mortality and liver-related mortality in non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of Hepatology*. 1 oct 2008;49(4):608-12.
339. Söderberg C, Stål P, Askling J, Glaumann H, Lindberg G, Marmur J, et al. Decreased survival of subjects with elevated liver function tests during a 28-year follow-up. *Hepatology*.

1 févr 2010;51(2):595-602.

340. Stepanova M, Younossi ZM. Independent Association Between Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Cardiovascular Disease in the US Population. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. 1 juin 2012;10(6):646-50.

341. Ekstedt M, Hagström H, Nasr P, Fredrikson M, Stål P, Kechagias S, et al. Fibrosis stage is the strongest predictor for disease-specific mortality in NAFLD after up to 33 years of follow-up. *Hepatology*. 1 mai 2015;61(5):1547-54.

342. Targher G, Byrne CD, Lonardo A, Zoppini G, Barbui C. Non-alcoholic fatty liver disease and risk of incident cardiovascular disease: A meta-analysis. *Journal of Hepatology*. 1 sept 2016;65(3):589-600.

343. Dixon JB, Bhathal PS, O'Brien PE. Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Predictors of Nonalcoholic Steatohepatitis and Liver Fibrosis in the Severely Obese. *Gastroenterology*. 1 juill 2001;121(1):91-100.

344. Donati G, Stagni B, Piscaglia F, Venturoli N, Morselli-Labate AM, Rasciti L, et al. Increased prevalence of fatty liver in arterial hypertensive patients with normal liver enzymes: role of insulin resistance. *Gut*. juill 2004;53(7):1020-3.

345. Gastaldelli A, Kozakova M, Højlund K, Flyvbjerg A, Favuzzi A, Mitrakou A, et al. Fatty liver is associated with insulin resistance, risk of coronary heart disease, and early atherosclerosis in a large European population. *Hepatology*. 1 mai 2009;49(5):1537-44.

346. Targher G, Zoppini G, Day CP. Risk of all-cause and cardiovascular mortality in patients with chronic liver disease. *Gut*. 1 nov 2011;60(11):1602.

347. Bhatia LS, Curzen NP, Calder PC, Byrne CD. Non-alcoholic fatty liver disease: a new and important cardiovascular risk factor? *European Heart Journal*. 8 mars 2012;33(10):1190-200.

348. Chang E, Park C-Y, Park SW. Role of thiazolidinediones, insulin sensitizers, in non-alcoholic fatty liver disease. *J Diabetes Investig*. 2013/07/01 éd. 27 nov 2013;4(6):517-24.

349. Bugianesi E, Gastaldelli A, Vanni E, Gambino R, Cassader M, Baldi S, et al. Insulin resistance in non-diabetic patients with non-alcoholic fatty liver disease: sites and mechanisms. *Diabetologia*. 1 avr 2005;48(4):634-42.

350. Gastaldelli A. Relationship between hepatic/visceral fat and hepatic insulin

resistance in nondiabetic and type 2 diabetic subjects. *Gastroenterology*. 2007;133.

351. Ference BA, Kastelein JJP, Ray KK, Ginsberg HN, Chapman MJ, Packard CJ, et al. Association of Triglyceride-Lowering LPL Variants and LDL-C-Lowering LDLR Variants With Risk of Coronary Heart Disease. *JAMA*. 29 janv 2019;321(4):364-73.

352. Borén J, Chapman MJ, Krauss RM, Packard CJ, Bentzon JF, Binder CJ, et al. Low-density lipoproteins cause atherosclerotic cardiovascular disease: pathophysiological, genetic, and therapeutic insights: a consensus statement from the European Atherosclerosis Society Consensus Panel. *European Heart Journal* [Internet]. 13 févr 2020 [cité 24 avr 2020];(ehz962). Disponible sur: <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehz962>

353. Browning JD. Statins and hepatic steatosis: Perspectives from the Dallas Heart Study. *Hepatology*. 1 août 2006;44(2):466-71.

354. Targher G, Chonchol M, Miele L, Zoppini G, Pichiri I, Muggeo M. Nonalcoholic Fatty Liver Disease as a Contributor to Hypercoagulation and Thrombophilia in the Metabolic Syndrome. *Semin Thromb Hemost*. 18 mai 2009;35(03):277-87.

355. Chapman MJ, Ginsberg HN, Amarenco P, Andreotti F, Borén J, Catapano AL, et al. Triglyceride-rich lipoproteins and high-density lipoprotein cholesterol in patients at high risk of cardiovascular disease: evidence and guidance for management. *Eur Heart J*. 2011/04/29 éd. juin 2011;32(11):1345-61.

356. Brown MS, Goldstein JL. Selective versus Total Insulin Resistance: A Pathogenic Paradox. *Cell Metabolism*. 6 févr 2008;7(2):95-6.

357. Gaggini M, Morelli M, Buzzigoli E, DeFronzo RA, Bugianesi E, Gastaldelli A. Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and its connection with insulin resistance, dyslipidemia, atherosclerosis and coronary heart disease. *Nutrients*. 10 mai 2013;5(5):1544-60.

358. Stefan N, Haring H-U. The role of hepatokines in metabolism. *Nat Rev Endocrinol*. mars 2013;9(3):144-52.

359. Dongiovanni P, Valenti L. Genetics of nonalcoholic fatty liver disease. *Metabolism*. 1 août 2016;65(8):1026-37.

360. Hussain MM, Shi J, Dreizen P. Microsomal triglyceride transfer protein and its role in apoB-lipoprotein assembly. *Journal of Lipid Research*. 1 janv 2003;44(1):22-32.

361. Chen S, Birk DE. The regulatory roles of small leucine-rich proteoglycans in

extracellular matrix assembly. *The FEBS Journal*. 1 mai 2013;280(10):2120-37.

362. Fang J, Wang S-Q, Smiley E, Bonadio J. Genes Coding for Mouse Activin  $\beta$ C and  $\beta$ E Are Closely Linked and Exhibit a Liver-Specific Expression Pattern in Adult Tissues. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 24 févr 1997;231(3):655-61.

363. Zaragosi L-E, Wdziekonski B, Villageois P, Keophiphath M, Maumus M, Tchkonja T, et al. Activin A Plays a Critical Role in Proliferation and Differentiation of Human Adipose Progenitors. *Diabetes*. 1 oct 2010;59(10):2513.

364. Yndestad A, Haukeland JW, Dahl TB, Bjoro K, Gladhaug IP, Berge C, et al. A complex role of Activin A in non-alcoholic fatty liver disease. *American Journal of Gastroenterology*. 2009;104(9):2196-205.

365. Hashimoto O, Funaba M, Sekiyama K, Doi S, Shindo D, Satoh R, et al. Activin E Controls Energy Homeostasis in Both Brown and White Adipose Tissues as a Hepatokine. *Cell Reports*. 30 oct 2018;25(5):1193-203.

366. Ungerleider NA, Bonomi LM, Brown ML, Schneyer AL. Increased Activin Bioavailability Enhances Hepatic Insulin Sensitivity While Inducing Hepatic Steatosis in Male Mice. *Endocrinology*. 1 juin 2013;154(6):2025-33.

367. Butler AA. Low circulating adropin concentrations with obesity and aging correlate with risk factors for metabolic disease and increase after gastric bypass surgery in humans. *J Clin Endocrinol Metab*. 2012;97.

368. Chen S, Zeng K, Liu Q, Guo Z, Zhang S, Chen X, et al. Adropin deficiency worsens HFD-induced metabolic defects. *Cell Death & Disease*. 1 août 2017;8(8):e3008-e3008.

369. Ganesh Kumar K, Zhang J, Gao S, Rossi J, McGuinness OP, Halem HH, et al. Adropin deficiency is associated with increased adiposity and insulin resistance. *Obesity (Silver Spring)*. 2012/02/09 éd. juill 2012;20(7):1394-402.

370. Gao S, McMillan RP, Jacas J, Zhu Q, Li X, Kumar GK, et al. Regulation of Substrate Oxidation Preferences in Muscle by the Peptide Hormone Adropin. *Diabetes*. 1 oct 2014;63(10):3242.

371. Targher G, Bertolini L, Poli F, Rodella S, Scala L, Tessari R, et al. Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Risk of Future Cardiovascular Events Among Type 2 Diabetic Patients. *Diabetes*. 1 déc 2005;54(12):3541.

372. Gao S, McMillan RP, Zhu Q, Lopaschuk GD, Hulver MW, Butler AA. Therapeutic effects of adropin on glucose tolerance and substrate utilization in diet-induced obese mice with insulin resistance. *Molecular Metabolism*. 1 avr 2015;4(4):310-24.
373. Kumar KG, Trevaskis JL, Lam DD, Sutton GM, Koza RA, Chouljenko VN, et al. Identification of Adropin as a Secreted Factor Linking Dietary Macronutrient Intake with Energy Homeostasis and Lipid Metabolism. *Cell Metabolism*. 6 déc 2008;8(6):468-81.
374. Ingerslev B, Hansen JS, Hoffmann C, Clemmesen JO, Secher NH, Scheler M, et al. Angiotensin-like protein 4 is an exercise-induced hepatokine in humans, regulated by glucagon and cAMP. *Molecular Metabolism*. 1 oct 2017;6(10):1286-95.
375. McQueen AE, Kanamaluru D, Yan K, Gray NE, Wu L, Li M-L, et al. The C-terminal fibrinogen-like domain of angiotensin-like 4 stimulates adipose tissue lipolysis and promotes energy expenditure. *Journal of Biological Chemistry*. 29 sept 2017;292(39):16122-34.
376. Robal T, Larsson M, Martin M, Olivecrona G, Lookene A. Fatty Acids Bind Tightly to the N-terminal Domain of Angiotensin-like Protein 4 and Modulate Its Interaction with Lipoprotein Lipase. *Journal of Biological Chemistry*. 24 août 2012;287(35):29739-52.
377. Hansen JS, Pedersen BK, Xu G, Lehmann R, Weigert C, Plomgaard P. Exercise-Induced Secretion of FGF21 and Follistatin Are Blocked by Pancreatic Clamp and Impaired in Type 2 Diabetes. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 1 juill 2016;101(7):2816-25.
378. Romeo S, Pennacchio LA, Fu Y, Boerwinkle E, Tybjaerg-Hansen A, Hobbs HH, et al. Population-based resequencing of ANGPTL4 uncovers variations that reduce triglycerides and increase HDL. *Nature Genetics*. 1 avr 2007;39(4):513-6.
379. Desai U, Lee E-C, Chung K, Gao C, Gay J, Key B, et al. Lipid-lowering effects of anti-angiotensin-like 4 antibody recapitulate the lipid phenotype found in angiotensin-like 4 knockout mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 10 juill 2007;104(28):11766.
380. Kersten S, Mandard S, Tan NS, Escher P, Metzger D, Chambon P, et al. Characterization of the Fasting-induced Adipose Factor FIAF, a Novel Peroxisome Proliferator-activated Receptor Target Gene. *Journal of Biological Chemistry*. 15 sept 2000;275(37):28488-93.
381. Mizutani N, Ozaki N, Seino Y, Fukami A, Sakamoto E, Fukuyama T, et al. Reduction of Insulin Signaling Upregulates Angiotensin-like Protein 4 Through Elevated Free Fatty

Acids in Diabetic Mice. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 08.11.2011. 8 mars 2012;120(03):139-44.

382. Xu A, Lam MC, Chan KW, Wang Y, Zhang J, Hoo RLC, et al. Angiotensin-like protein 4 decreases blood glucose and improves glucose tolerance but induces hyperlipidemia and hepatic steatosis in mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 26 avr 2005;102(17):6086.

383. Singh AK, Aryal B, Chaube B, Rotllan N, Varela L, Horvath TL, et al. Brown adipose tissue derived ANGPTL4 controls glucose and lipid metabolism and regulates thermogenesis. *Molecular Metabolism*. 1 mai 2018;11:59-69.

384. Drucker DJ, Nauck MA. The incretin system: glucagon-like peptide-1 receptor agonists and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in type 2 diabetes. *The Lancet*. 11 nov 2006;368(9548):1696-705.

385. Baumeier C, Schlüter L, Saussenthaler S, Laeger T, Rödiger M, Alaze SA, et al. Elevated hepatic DPP4 activity promotes insulin resistance and non-alcoholic fatty liver disease. *Molecular Metabolism*. 1 oct 2017;6(10):1254-63.

386. Marques AP, Cunha-Santos J, Leal H, Sousa-Ferreira L, Pereira de Almeida L, Cavadas C, et al. Dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) inhibition prevents fibrosis in adipose tissue of obese mice. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. 1 mars 2018;1862(3):403-13.

387. Zheng W, Zhou J, Song S, Kong W, Xia W, Chen L, et al. Dipeptidyl-Peptidase 4 Inhibitor Sitagliptin Ameliorates Hepatic Insulin Resistance by Modulating Inflammation and Autophagy in ob/ob Mice. *Veglio F, éditeur. International Journal of Endocrinology*. 19 juill 2018;2018:8309723.

388. Mori K, Emoto M, Yokoyama H, Araki T, Teramura M, Koyama H, et al. Association of Serum Fetuin-A With Insulin Resistance in Type 2 Diabetic and Nondiabetic Subjects. *Diabetes Care*. 1 févr 2006;29(2):468.

389. Peter A, Kovarova M, Staiger H, Machann J, Schick F, Königsrainer A, et al. The hepatokines fetuin-A and fetuin-B are upregulated in the state of hepatic steatosis and may differently impact on glucose homeostasis in humans. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. 14 nov 2017;314(3):E266-73.

390. Jung C-H, Kim B-Y, Kim C-H, Kang S-K, Jung S-H, Mok J-O. Associations of serum fetuin-A levels with insulin resistance and vascular complications in patients with type 2

diabetes. *Diabetes and Vascular Disease Research*. 27 juin 2013;10(5):459-67.

391. Awazawa M, Gabel P, Tsaousidou E, Nolte H, Krüger M, Schmitz J, et al. A microRNA screen reveals that elevated hepatic ectodysplasin A expression contributes to obesity-induced insulin resistance in skeletal muscle. *Nature Medicine*. 1 déc 2017;23(12):1466-73.

392. Shim YS, Kang MJ, Oh YJ, Baek JW, Yang S, Hwang IT. Fetuin-A as an Alternative Marker for Insulin Resistance and Cardiovascular Risk in Prepubertal Children. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis*. 2017;24(10):1031-8.

393. Ou H-Y, Wu H-T, Hung H-C, Yang Y-C, Wu J-S, Chang C-J. Endoplasmic Reticulum Stress Induces the Expression of Fetuin-A to Develop Insulin Resistance. *Endocrinology*. 1 juill 2012;153(7):2974-84.

394. Pierre N, Deldicque L, Barbé C, Nalsain D, Cani PD, Francaux M. Toll-like receptor 4 knockout mice are protected against endoplasmic reticulum stress induced by high-fat diet. *PLoS ONE*. 2013;8(5):e65061.

395. Auberger P, Falquerho L, Contreres JO, Pages G, Cam GL, Rossi B, et al. Characterization of a natural inhibitor of the insulin receptor tyrosine kinase: cDNA cloning, purification, and anti-mitogenic activity. *Cell*. 25 août 1989;58(4):631-40.

396. Pal D. Fetuin-A acts as an endogenous ligand of TLR4 to promote lipid-induced insulin resistance. *Nat Med*. 2012;18.

397. Mukhuty A, Fouzder C, Mukherjee S, Malick C, Mukhopadhyay S, Bhattacharya S, et al. Palmitate induced Fetuin-A secretion from pancreatic  $\beta$ -cells adversely affects its function and elicits inflammation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 30 sept 2017;491(4):1118-24.

398. Zhu J, Wan X, Wang Y, Zhu K, Li C, Yu C, et al. Serum fetuin B level increased in subjects of nonalcoholic fatty liver disease: a case-control study. *Endocrine*. 1 avr 2017;56(1):208-11.

399. Li Z, Lin M, Liu C, Wang D, Shi X, Chen Z, et al. Fetuin-B links nonalcoholic fatty liver disease to type 2 diabetes via inducing insulin resistance: Association and path analyses. *Cytokine*. 1 août 2018;108:145-50.

400. Qu H, Qiu Y, Wang Y, Liao Y, Zheng Y, Zheng H. Plasma fetuin-B concentrations are associated with insulin resistance and first-phase glucose-stimulated insulin secretion in

individuals with different degrees of glucose tolerance. *Diabetes & Metabolism*. 1 déc 2018;44(6):488-92.

401. Best JD, Kahn SE, Ader M, Watanabe RM, Ni TC, Bergman RN. Role of Glucose Effectiveness in the Determination of Glucose Tolerance. *Diabetes Care*. 1 sept 1996;19(9):1018.

402. Meex RC, Hoy AJ, Morris A, Brown RD, Lo JCY, Burke M, et al. Fetuin B Is a Secreted Hepatocyte Factor Linking Steatosis to Impaired Glucose Metabolism. *Cell Metabolism*. 22(6):1078-89.

403. Staiger H, Keuper M, Berti L, Hrabě de Angelis M, Häring H-U. Fibroblast Growth Factor 21—Metabolic Role in Mice and Men. *Endocrine Reviews*. 28 juill 2017;38(5):468-88.

404. Nishimura T, Nakatake Y, Konishi M, Itoh N. Identification of a novel FGF, FGF-21, preferentially expressed in the liver<sup>11</sup>The nucleotide sequence data reported in this paper will appear in the DDBJ, EMBL and GenBank nucleotide sequence databases with accession numbers AB021975 and AB025718. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression*. 21 juin 2000;1492(1):203-6.

405. Zhao J, Xiong X, Li Y, Liu X, Wang T, Zhang H, et al. Hepatic F-Box Protein FBXW7 Maintains Glucose Homeostasis Through Degradation of Fetuin-A. *Diabetes*. 1 mai 2018;67(5):818.

406. Coskun T, Bina HA, Schneider MA, Dunbar JD, Hu CC, Chen Y, et al. Fibroblast Growth Factor 21 Corrects Obesity in Mice. *Endocrinology*. 1 déc 2008;149(12):6018-27.

407. Badman MK, Pissios P, Kennedy AR, Koukos G, Flier JS, Maratos-Flier E. Hepatic Fibroblast Growth Factor 21 Is Regulated by PPAR $\alpha$  and Is a Key Mediator of Hepatic Lipid Metabolism in Ketotic States. *Cell Metabolism*. 6 juin 2007;5(6):426-37.

408. Schlein C, Talukdar S, Heine M, Fischer AW, Krott LM, Nilsson SK, et al. FGF21 Lowers Plasma Triglycerides by Accelerating Lipoprotein Catabolism in White and Brown Adipose Tissues. *Cell Metabolism*. 8 mars 2016;23(3):441-53.

409. Lee S-J, McPherron AC. Regulation of myostatin activity and muscle growth. *Proc Natl Acad Sci USA*. 31 juill 2001;98(16):9306.

410. Tao R, Wang C, Stöhr O, Qiu W, Hu Y, Miao J, et al. Inactivating hepatic follistatin alleviates hyperglycemia. *Nature Medicine*. 1 juill 2018;24(7):1058-69.

411. Wente W, Efanov AM, Brenner M, Kharitonov A, Köster A, Sandusky GE, et al. Fibroblast Growth Factor-21 Improves Pancreatic  $\beta$ -Cell Function and Survival by Activation of Extracellular Signal-Regulated Kinase 1/2 and Akt Signaling Pathways. *Diabetes*. 1 sept 2006;55(9):2470.
412. Perakakis N, Kokkinos A, Peradze N, Tentolouris N, Ghaly W, Tsilingiris D, et al. Follistatins in glucose regulation in healthy and obese individuals. *Diabetes, Obesity and Metabolism*. 1 mars 2019;21(3):683-90.
413. Ramnath D, Irvine KM, Lukowski SW, Horsfall LU, Loh Z, Clouston AD, et al. Hepatic expression profiling identifies steatosis-independent and steatosis-driven advanced fibrosis genes. *JCI Insight* [Internet]. 25 juill 2018;3(14). Disponible sur: <https://doi.org/10.1172/jci.insight.120274>
414. Wu H, Ballantyne CM. Skeletal muscle inflammation and insulin resistance in obesity. *J Clin Invest*. 3 janv 2017;127(1):43-54.
415. Hara H, Yoshimura H, Uchida S, Toyoda Y, Aoki M, Sakai Y, et al. Molecular cloning and functional expression analysis of a cDNA for human hepassocin, a liver-specific protein with hepatocyte mitogenic activity<sup>1</sup>The sequence for human hepassocin has been deposited in GenBank/EMBL under the accession number D87342.1. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression*. 30 juill 2001;1520(1):45-53.
416. Gao M, Zhan Y-Q, Yu M, Ge C-H, Li C-Y, Zhang J-H, et al. Hepassocin activates the EGFR/ERK cascade and induces proliferation of L02 cells through the Src-dependent pathway. *Cellular Signalling*. 1 oct 2014;26(10):2161-6.
417. Sreekumar R, Rosado B, Rasmussen D, Charlton M. Hepatic gene expression in histologically progressive nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*. 2003;38(1):244-51.
418. Jung TW, Chung YH, Kim H-C, Abd El-Aty AM, Jeong JH. Hyperlipidemia-induced hepassocin in the liver contributes to insulin resistance in skeletal muscle. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 15 juill 2018;470:26-33.
419. Wu H-T, Ou H-Y, Hung H-C, Su Y-C, Lu F-H, Wu J-S, et al. A novel hepatokine, HFREP1, plays a crucial role in the development of insulin resistance and type 2 diabetes. *Diabetologia*. 1 août 2016;59(8):1732-42.
420. Andersson U, Tracey KJ. HMGB1 Is a Therapeutic Target for Sterile Inflammation and Infection. *Annu Rev Immunol*. 22 mars 2011;29(1):139-62.

421. Yates KP, Deppe R, Comerford M, Masuoka H, Cummings OW, Tonascia J, et al. Serum high mobility group box 1 protein levels are not associated with either histological severity or treatment response in children and adults with nonalcoholic fatty liver disease. *PLoS One*. 2 nov 2017;12(11):e0185813-e0185813.
422. Wu H-T, Lu F-H, Ou H-Y, Su Y-C, Hung H-C, Wu J-S, et al. The role of Hepassocin in the development of non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of Hepatology*. 1 nov 2013;59(5):1065-72.
423. Yamagoe S, Mizuno S, Suzuki K. Molecular cloning of human and bovine LECT2 having a neutrophil chemotactic activity and its specific expression in the liver. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression*. 4 mars 1998;1396(1):105-13.
424. Li L, Chen L, Hu L, Liu Y, Sun H-Y, Tang J, et al. Nuclear factor high-mobility group box1 mediating the activation of toll-like receptor 4 signaling in hepatocytes in the early stage of nonalcoholic fatty liver disease in mice. *Hepatology*. 1 nov 2011;54(5):1620-30.
425. Stefan N, Häring H-U. Circulating fetuin-A and free fatty acids interact to predict insulin resistance in humans. *Nature Medicine*. 1 avr 2013;19(4):394-5.
426. Zeng W, Shan W, Gao L, Gao D, Hu Y, Wang G, et al. Inhibition of HMGB1 release via salvianolic acid B-mediated SIRT1 up-regulation protects rats against non-alcoholic fatty liver disease. *Scientific Reports*. 3 nov 2015;5(1):16013.
427. Chikamoto K, Misu H, Takayama H, Kikuchi A, Ishii K, Lan F, et al. Rapid response of the steatosis-sensing hepatokine LECT2 during diet-induced weight cycling in mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 23 sept 2016;478(3):1310-6.
428. Hwang H-J, Jung TW, Kim B-H, Hong HC, Seo JA, Kim SG, et al. A dipeptidyl peptidase-IV inhibitor improves hepatic steatosis and insulin resistance by AMPK-dependent and JNK-dependent inhibition of LECT2 expression. *Biochemical Pharmacology*. 1 nov 2015;98(1):157-66.
429. Tombran-Tink J, Mazuruk K, Rodriguez I, Chung D, Linker T, Englander E, et al. Organization, evolutionary conservation, expression and unusual Alu density of the human gene for pigment epithelium-derived factor, a unique neurotrophic serpin. *Mol Vis*. nov 1996;2:11.
430. Yilmaz Y, Eren F, Ayyildiz T, Colak Y, Kurt R, Senates E, et al. Serum pigment epithelium-derived factor levels are increased in patients with biopsy-proven nonalcoholic

fatty liver disease and independently associated with liver steatosis. *Clinica Chimica Acta*. 20 nov 2011;412(23):2296-9.

431. Lan F, Misu H, Chikamoto K, Takayama H, Kikuchi A, Mohri K, et al. LECT2 Functions as a Hepatokine That Links Obesity to Skeletal Muscle Insulin Resistance. *Diabetes*. 22 avr 2014;63(5):1649.

432. Yamagishi S, Adachi H, Abe A, Yashiro T, Enomoto M, Furuki K, et al. Elevated Serum Levels of Pigment Epithelium-Derived Factor in the Metabolic Syndrome. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 1 juin 2006;91(6):2447-50.

433. Sabater M, Moreno-Navarrete JM, José Ortega F, Pardo G, Salvador J, Ricart W, et al. Circulating Pigment Epithelium-Derived Factor Levels Are Associated with Insulin Resistance and Decrease after Weight Loss. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 1 oct 2010;95(10):4720-8.

434. Dai Z, Zhou T, Li C, Qi W, Mao Y, Lu J, et al. Intracellular pigment epithelium-derived factor contributes to triglyceride degradation. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 1 sept 2013;45(9):2076-86.

435. Yoshida T, Akiba J, Matsui T, Nakamura K, Hisamoto T, Abe M, et al. Pigment Epithelium-Derived Factor (PEDF) Prevents Hepatic Fat Storage, Inflammation, and Fibrosis in Dietary Steatohepatitis of Mice. *Digestive Diseases and Sciences*. 1 juin 2017;62(6):1527-36.

436. Ho T-C, Chen S-L, Shih S-C, Wu J-Y, Han W-H, Cheng H-C, et al. Pigment epithelium-derived factor is an intrinsic antifibrosis factor targeting hepatic stellate cells. *Am J Pathol*. 2010/08/13 éd. oct 2010;177(4):1798-811.

437. Crowe S, Wu LE, Economou C, Turpin SM, Matzaris M, Hoehn KL, et al. Pigment epithelium-derived factor contributes to insulin resistance in obesity. *Cell metabolism*. juill 2009;10(1):40-7.

438. Kanai M, Raz A, Goodman DS. Retinol-binding protein: the transport protein for vitamin A in human plasma. *J Clin Invest*. 1 sept 1968;47(9):2025-44.

439. Cai H, Lu S, Chen Y, Das MBBS MRCOG S, Niu Z, Zhuo G, et al. Serum retinol binding protein 4 and galectin-3 binding protein as novel markers for postmenopausal nonalcoholic fatty liver disease. *Clinical Biochemistry*. 1 juin 2018;56:95-101.

440. Perseghin G, Lattuada G, De Cobelli F, Esposito A, Belloni E, Canu T, et al. Serum

Retinol-Binding Protein-4, Leptin, and Adiponectin Concentrations Are Related to Ectopic Fat Accumulation. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 1 déc 2007;92(12):4883-8.

441. Wu H, Jia W, Bao Y, Lu J, Zhu J, Wang R, et al. Serum retinol binding protein 4 and nonalcoholic fatty liver disease in patients with type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Research and Clinical Practice*. 1 févr 2008;79(2):185-90.

442. Graham TE, Yang Q, Blüher M, Hammarstedt A, Ciaraldi TP, Henry RR, et al. Retinol-Binding Protein 4 and Insulin Resistance in Lean, Obese, and Diabetic Subjects. *N Engl J Med*. 15 juin 2006;354(24):2552-63.

443. LEE J-W, LEE H-R, SHIM J-Y, IM J-A, LEE D-C. Abdominal Visceral Fat Reduction Is Associated with Favorable Changes of Serum Retinol Binding Protein-4 in Nondiabetic Subjects. *Endocrine Journal*. 2008;55(5):811-8.

444. Haider DG. Serum retinol-binding protein 4 is reduced after weight loss in morbidly obese subjects. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007;92.

445. Yang Q. Serum retinol binding protein 4 contributes to insulin resistance in obesity and type 2 diabetes. *Nature*. 2005;436.

446. Oo SM, Misu H, Saito Y, Tanaka M, Kato S, Kita Y, et al. Serum selenoprotein P, but not selenium, predicts future hyperglycemia in a general Japanese population. *Scientific Reports*. 13 nov 2018;8(1):16727.

447. Chen M, Liu B, Wilkinson D, Hutchison AT, Thompson CH, Wittert GA, et al. Selenoprotein P is elevated in individuals with obesity, but is not independently associated with insulin resistance. *Obesity Research & Clinical Practice*. 1 mars 2017;11(2):227-32.

448. Yang SJ. Serum selenoprotein P levels in patients with type 2 diabetes and prediabetes: implications for insulin resistance, inflammation, and atherosclerosis. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011;96.

449. Choi HY, Hwang SY, Lee CH, Hong HC, Yang SJ, Yoo HJ, et al. Increased Selenoprotein P Levels in Subjects with Visceral Obesity and Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Diabetes Metab J*. févr 2013;37(1):63-71.

450. Jung TW, Lee SY, Hong HC, Choi HY, Yoo HJ, Baik SH, et al. AMPK activator-mediated inhibition of endoplasmic reticulum stress ameliorates carrageenan-induced insulin resistance through the suppression of selenoprotein P in HepG2 hepatocytes.

Molecular and Cellular Endocrinology. 25 janv 2014;382(1):66-73.

451. Norseen J, Hosooka T, Hammarstedt A, Yore MM, Kant S, Aryal P, et al. Retinol-Binding Protein 4 Inhibits Insulin Signaling in Adipocytes by Inducing Proinflammatory Cytokines in Macrophages through a c-Jun N-Terminal Kinase- and Toll-Like Receptor 4-Dependent and Retinol-Independent Mechanism. *Mol Cell Biol*. 15 mai 2012;32(10):2010.

452. Fedders R, Muenzner M, Weber P, Sommerfeld M, Knauer M, Kedziora S, et al. Liver-secreted RBP4 does not impair glucose homeostasis in mice. *Journal of Biological Chemistry*. 28 sept 2018;293(39):15269-76.

453. Misu H, Takamura T, Takayama H, Hayashi H, Matsuzawa-Nagata N, Kurita S, et al. A Liver-Derived Secretory Protein, Selenoprotein P, Causes Insulin Resistance. *Cell Metabolism*. 3 nov 2010;12(5):483-95.

454. Jänne M, Hammond GL. Hepatocyte Nuclear Factor-4 Controls Transcription from a TATA-less Human Sex Hormone-binding Globulin Gene Promoter. *Journal of Biological Chemistry*. 18 déc 1998;273(51):34105-14.

455. Selva DM, Hammond GL. Peroxisome-Proliferator Receptor  $\gamma$  Represses Hepatic Sex Hormone-Binding Globulin Expression. *Endocrinology*. 1 mai 2009;150(5):2183-9.

456. Hua X, Li M, Pan F, Xiao Y, Cui W, Hu Y. Non-alcoholic fatty liver disease is an influencing factor for the association of SHBG with metabolic syndrome in diabetes patients. *Scientific Reports*. 6 nov 2017;7(1):14532.

457. Bledar Daka, Thord Rosen, Per Anders Jansson, Lennart Råstam, Charlotte A Larsson, Ulf Lindblad. Inverse association between serum insulin and sex hormone-binding globulin in a population survey in Sweden. *Endocrine Connections*. 2013;2(1):18-22.

458. Kavanagh K, Espeland MA, Sutton-Tyrrell K, Barinas-Mitchell E, El Khoudary SR, Wildman RP. Liver fat and SHBG affect insulin resistance in midlife women: the Study of Women's Health Across the Nation (SWAN). *Obesity (Silver Spring)*. mai 2013;21(5):1031-8.

459. Mita Y, Nakayama K, Inari S, Nishito Y, Yoshioka Y, Sakai N, et al. Selenoprotein P-neutralizing antibodies improve insulin secretion and glucose sensitivity in type 2 diabetes mouse models. *Nature Communications*. 21 nov 2017;8(1):1658.

460. Niskanen L, Laaksonen DE, Punnonen K, Mustajoki P, Kaukua J, Rissanen A. Changes in sex hormone-binding globulin and testosterone during weight loss and weight

maintenance in abdominally obese men with the metabolic syndrome. *Diabetes, Obesity and Metabolism*. 1 mai 2004;6(3):208-15.

461. Simó R, Barbosa-Desongles A, Sáez-Lopez C, Lecube A, Hernandez C, Selva DM. Molecular Mechanism of TNF $\alpha$ -Induced Down-Regulation of SHBG Expression. *Molecular Endocrinology*. 1 mars 2012;26(3):438-46.

462. PLYMATE SR, MATEJ LA, JONES RE, FRIEDL KE. Inhibition of Sex Hormone-Binding Globulin Production in the Human Hepatoma (Hep G2) Cell Line by Insulin and Prolactin\*. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 1 sept 1988;67(3):460-4.

463. Saez-Lopez C, Brianso-Llort L, Torres-Torronteras J, Simó R, Hammond GL, Selva DM. Resveratrol Increases Hepatic SHBG Expression through Human Constitutive Androstane Receptor: a new Contribution to the French Paradox. *Scientific Reports*. 25 sept 2017;7(1):12284.

464. Wang Q, Sharma VP, Shen H, Xiao Y, Zhu Q, Xiong X, et al. The hepatokine Tsukushi gates energy expenditure via brown fat sympathetic innervation. *Nature Metabolism*. 2019;1(2):251-60.

465. Hirsova P, Ibrahim SH, Krishnan A, Verma VK, Bronk SF, Werneburg NW, et al. Lipid-Induced Signaling Causes Release of Inflammatory Extracellular Vesicles From Hepatocytes. *Gastroenterology*. 2016/01/05 éd. avr 2016;150(4):956-67.

466. Kakazu E, Mauer AS, Yin M, Malhi H. Hepatocytes release ceramide-enriched pro-inflammatory extracellular vesicles in an IRE1 $\alpha$ -dependent manner. *Journal of Lipid Research*. 1 févr 2016;57(2):233-45.

467. Jones JG. Hepatic glucose and lipid metabolism. *Diabetologia*. 1 juin 2016;59(6):1098-103.

468. Sáez-López C, Salcedo-Allende MT, Hernandez C, Simó-Servat O, Simó R, Selva DM. Sex Hormone–Binding Globulin Expression Correlates With Acetyl-Coenzyme A Carboxylase and Triglyceride Content in Human Liver. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 28 nov 2018;104(5):1500-7.

469. Schaefer L, Iozzo RV. Biological Functions of the Small Leucine-rich Proteoglycans: From Genetics to Signal Transduction. *Journal of Biological Chemistry*. 1 août 2008;283(31):21305-9.

470. Hultgårdh-Nilsson A, Borén J, Chakravarti S. The small leucine-rich repeat

proteoglycans in tissue repair and atherosclerosis. *J Intern Med.* nov 2015;278(5):447-61.

471. Appunni S, Anand V, Khandelwal M, Gupta N, Rubens M, Sharma A. Small Leucine Rich Proteoglycans (decorin, biglycan and lumican) in cancer. *Clinica Chimica Acta.* 1 avr 2019;491:1-7.

472. Kram V, Kilts TM, Bhattacharyya N, Li L, Young MF. Small leucine rich proteoglycans, a novel link to osteoclastogenesis. *Scientific Reports.* 3 oct 2017;7(1):12627.

473. Niimori D, Kawano R, Niimori-Kita K, Ihn H, Ohta K. Tsukushi is involved in the wound healing by regulating the expression of cytokines and growth factors. *Journal of Cell Communication and Signaling.* 1 sept 2014;8(3):173-7.

474. Schaefer L. Small Leucine-Rich Proteoglycans in Kidney Disease. *J Am Soc Nephrol.* 1 juill 2011;22(7):1200.

475. Appunni S, Anand V, Khandelwal M, Gupta N, Rubens M, Sharma A. Small Leucine Rich Proteoglycans (decorin, biglycan and lumican) in cancer. *Clinica Chimica Acta.* 1 avr 2019;491:1-7.

476. Schaefer L. Extracellular matrix molecules: endogenous danger signals as new drug targets in kidney diseases. *Current Opinion in Pharmacology.* 1 avr 2010;10(2):185-90.

477. Ward M, Ajuwon KM. Regulation of pre-adipocyte proliferation and apoptosis by the small leucine-rich proteoglycans, biglycan and decorin. *Cell Proliferation.* 2011;44(4):343-51.

478. Meyer D, Krull N, Dreher K, Gressner A. Biglycan and decorin gene expression in normal and fibrotic rat liver: cellular localization and regulatory factors. *Hepatology.* 1992;16(1):204-16.

479. Baghy K, Dezső K, László V, Fullár A, Péterfia B, Paku S, et al. Ablation of the decorin gene enhances experimental hepatic fibrosis and impairs hepatic healing in mice. *Laboratory Investigation.* 1 mars 2011;91(3):439-51.

480. Mormone E, Lu Y, Ge X, Fiel MI, Nieto N. Fibromodulin, an oxidative stress-sensitive proteoglycan, regulates the fibrogenic response to liver injury in mice. *Gastroenterology.* 2012;142(3):612-21.

481. Gawrieh S, Baye TM, Carless M, Wallace J, Komorowski R, Kleiner DE, et al. Hepatic Gene Networks in Morbidly Obese Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Obesity*

Surgery. 1 déc 2010;20(12):1698-709.

482. Krishnan A, Li X, Kao W-Y, Viker K, Butters K, Masuoka H, et al. Lumican, an extracellular matrix proteoglycan, is a novel requisite for hepatic fibrosis. *Laboratory Investigation*. 1 déc 2012;92(12):1712-25.

483. Ohta K, Lupo G, Kuriyama S, Keynes R, Holt CE, Harris WA, et al. Tsukushi functions as an organizer inducer by inhibition of BMP activity in cooperation with Chordin. *Developmental Cell*. 2013;7(3):347-58.

484. Kuriyama S, Lupo G, Ohta K, Ohnuma S, Harris WA, Tanaka H. Tsukushi controls ectodermal patterning and neural crest specification in *Xenopus* by direct regulation of BMP4 and X-delta-1 activity. *Development*. 1 janv 2006;133(1):75.

485. Morris S, Almeida A, Tanaka H, Ohta K, Ohnuma S. Tsukushi modulates Xnr2, FGF and BMP signaling: regulation of *Xenopus* germ layer formation. *PLoS ONE*. 2007;2(10):e1004.

486. Ohta K, Ito A, Kuriyama S, Lupo G, Kosaka M, Ohnuma S, et al. Tsukushi functions as a Wnt signaling inhibitor by competing with Wnt2b for binding to transmembrane protein Frizzled4. *Proc Natl Acad Sci USA*. 6 sept 2011;108(36):14962.

487. Nikitovic D, Berdiaki K, Chalkiadaki G, Karamanos N, Tzanakakis G. The role of SLRP-proteoglycans in osteosarcoma pathogenesis. *Connective Tissue Research*. 2008;49(3):235-8.

488. Rakhshanderhroo M, Hooiveld G, Müller M, Kersten S. Comparative Analysis of Gene Regulation by the Transcription Factor PPAR $\alpha$  between Mouse and Human. *PLoS ONE*. 2009;4(8):e6796.

489. COFFY S, DECAUX J-F, GIRARD J, de KEYZER Y, ASFARI M. Identification of a novel rat hepatic gene induced early by insulin, independently of glucose. *Biochemical Journal*. 14 déc 2004;385(1):165-71.

490. Ng W, Uetrecht J. Changes in gene expression induced by aromatic amine drugs: testing the danger hypothesis. *Journal of Immunotoxicology*. 2013;10(2):178-91.

491. Niimori D, Kawano R, Felemban A, Niimori-Kita K, Tanaka H, Ihn H, et al. Tsukushi controls the hair cycle by regulating TGF- $\beta$ 1 signaling. *Developmental Biology*. 1 déc 2012;372(1):81-7.

492. Kalamajski S, Oldberg Å. Homologous Sequence in Lumican and Fibromodulin Leucine-rich Repeat 5-7 Competes for Collagen Binding. *Journal of Biological Chemistry*. 2 janv 2009;284(1):534-9.
493. Schaefer L, Babelova A, Kiss E, Hausser H-J, Baliova M, Krzyzankova M, et al. The matrix component biglycan is proinflammatory and signals through Toll-like receptors 4 and 2 in macrophages. *J Clin Invest*. 2005/07/14 éd. août 2005;115(8):2223-33.
494. Nastase MV, Young MF, Schaefer L. Biglycan: a multivalent proteoglycan providing structure and signals. *J Histochem Cytochem*. 2012/07/20 éd. déc 2012;60(12):963-75.
495. Moreth K, Brodbeck R, Babelova A, Gretz N, Spieker T, Zeng-Brouwers J, et al. The proteoglycan biglycan regulates expression of the B cell chemoattractant CXCL13 and aggravates murine lupus nephritis. *J Clin Invest*. 2010/11/15 éd. déc 2010;120(12):4251-72.
496. Popovic ZV, Wang S, Papatriantafyllou M, Kaya Z, Porubsky S, Meisner M, et al. The proteoglycan biglycan enhances antigen-specific T cell activation potentially via MyD88 and TRIF pathways and triggers autoimmune perimyocarditis. *J Immunol*. 2011/11/16 éd. 15 déc 2011;187(12):6217-26.
497. Schaefer L, Iozzo RV. Small leucine-rich proteoglycans, at the crossroad of cancer growth and inflammation. *Current Opinion in Genetics & Development*. 1 févr 2012;22(1):56-7.
498. Uzi D, Barda L, Scaiewicz V, Mills M, Mueller T, Gonzalez-Rodriguez A, et al. CHOP is a critical regulator of acetaminophen-induced hepatotoxicity. *Journal of Hepatology*. 1 sept 2013;59(3):495-503.
499. Connolly MK, Ayo D, Malhotra A, Hackman M, Bedrosian AS, Ibrahim J, et al. Dendritic cell depletion exacerbates acetaminophen hepatotoxicity. *Hepatology*. 2 sept 2011;54(3):959-68.
500. Igusa Y, Yamashina S, Izumi K, Inami Y, Fukada H, Komatsu M, et al. Loss of autophagy promotes murine acetaminophen hepatotoxicity. *Journal of Gastroenterology*. 1 avr 2012;47(4):433-43.
501. Imaeda AB, Watanabe A, Sohail MA, Mahmood S, Mohamadnejad M, Sutterwala FS, et al. Acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice is dependent on Tlr9 and the Nalp3 inflammasome. *J Clin Invest*. 2 févr 2009;119(2):305-14.
502. Svensson L, Aszódi A, Reinholt FP, Fässler R, Heinegård D, Oldberg Å.

Fibromodulin-null Mice Have Abnormal Collagen Fibrils, Tissue Organization, and Altered Lumican Deposition in Tendon. *Journal of Biological Chemistry*. 2 avr 1999;274(14):9636-47.

503. Goldberg M, Rapoport O, Septier D, Palmier K, Hall R, Embery G, et al. Proteoglycans in Predentin: The Last 15 Micrometers Before Mineralization. *Connective Tissue Research*. 1 janv 2003;44(1):184-8.

504. AMEYE L, ARIA D, JEPSEN K, OLDBERG A, XU T, YOUNG MF. Abnormal collagen fibrils in tendons of biglycan/fibromodulin-deficient mice lead to gait impairment, ectopic ossification, and osteoarthritis. *The FASEB Journal*. 1 mai 2002;16(7):673-80.

505. Corsi A, Xu T, Chen X-D, Boyde A, Liang J, Mankani M, et al. Phenotypic Effects of Biglycan Deficiency Are Linked to Collagen Fibril Abnormalities, Are Synergized by Decorin Deficiency, and Mimic Ehlers-Danlos-Like Changes in Bone and Other Connective Tissues. *Journal of Bone and Mineral Research*. 1 juill 2002;17(7):1180-9.

506. Danielson KG, Baribault H, Holmes DF, Graham H, Kadler KE, Iozzo RV. Targeted Disruption of Decorin Leads to Abnormal Collagen Fibril Morphology and Skin Fragility. *Journal of Cell Biology*. 10 févr 1997;136(3):729-43.

507. Ameye L, Young MF. Mice deficient in small leucine-rich proteoglycans: novel in vivo models for osteoporosis, osteoarthritis, Ehlers-Danlos syndrome, muscular dystrophy, and corneal diseases. *Glycobiology*. 1 sept 2002;12(9):107R-116R.

508. Chakravarti S, Magnuson T, Lass JH, Jepsen KJ, LaMantia C, Carroll H. Lumican regulates collagen fibril assembly: skin fragility and corneal opacity in the absence of lumican. *J Cell Biol*. 1 juin 1998;141(5):1277-86.

509. Chakravarti S, Petroll WM, Hassell JR, Jester JV, Lass JH, Paul J, et al. Corneal opacity in lumican-null mice: defects in collagen fibril structure and packing in the posterior stroma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. oct 2000;41(11):3365-73.

510. Svensson L, Närlid I, Oldberg Å. Fibromodulin and lumican bind to the same region on collagen type I fibrils. *FEBS Letters*. 24 mars 2000;470(2):178-82.

511. Pellegata NS, Dieguez-Lucena JL, Joensuu T, Lau S, Montgomery KT, Krahe R, et al. Mutations in KERA, encoding keratocan, cause cornea plana. *Nature Genetics*. 1 mai 2000;25(1):91-5.

512. Khalil Maged F., Wagner William D., Goldberg Ira J. Molecular Interactions Leading

to Lipoprotein Retention and the Initiation of Atherosclerosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 1 déc 2004;24(12):2211-8.

513. Marzoll A, Melchior-Becker A, Cipollone F, Fischer JW. Small leucine-rich proteoglycans in atherosclerotic lesions: novel targets of chronic statin treatment? *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 1 févr 2011;15(2):232-43.

514. Mouchiroud M, Camiré É, Aldow M, Caron A, Jubinville É, Turcotte L, et al. The hepatokine Tsukushi is released in response to NAFLD and impacts cholesterol homeostasis. *JCI Insight* [Internet]. 8 août 2019;4(15). Disponible sur: <https://doi.org/10.1172/jci.insight.129492>

515. Xiong X, Wang Q, Wang S, Zhang J, Liu T, Guo L, et al. Mapping the molecular signatures of diet-induced NASH and its regulation by the hepatokine Tsukushi. *Molecular Metabolism*. 1 févr 2019;20:128-37.

516. Ito A, Shinmyo Y, Abe T, Oshima N, Tanaka H, Ohta K. Tsukushi is required for anterior commissure formation in mouse brain. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 26 nov 2010;402(4):813-8.

517. Tang T, Li L, Tang J, Li Y, Lin WY, Martin F, et al. A mouse knockout library for secreted and transmembrane proteins. *Nat Biotech*. juill 2010;28(7):749-55.

518. Almind K, Kahn CR. Genetic Determinants of Energy Expenditure and Insulin Resistance in Diet-Induced Obesity in Mice. *Diabetes*. 1 déc 2004;53(12):3274.

519. West DB, Boozer CN, Moody DL, Atkinson RL. Dietary obesity in nine inbred mouse strains. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 1 juin 1992;262(6):R1025-32.

520. Montgomery MK, Hallahan NL, Brown SH, Liu M, Mitchell TW, Cooney GJ, et al. Mouse strain-dependent variation in obesity and glucose homeostasis in response to high-fat feeding. *Diabetologia*. 1 mai 2013;56(5):1129-39.

521. Younossi Z, Anstee QM, Marietti M, Hardy T, Henry L, Eslam M, et al. Global burden of NAFLD and NASH: trends, predictions, risk factors and prevention. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*. 1 janv 2018;15(1):11-20.

522. Hofmann WE, Liu X, Bearden CM, Harper M-E, Kozak LP. Effects of Genetic Background on Thermoregulation and Fatty Acid-induced Uncoupling of Mitochondria in UCP1-deficient Mice. *Journal of Biological Chemistry*. 13 avr 2001;276(15):12460-5.

523. Nedergaard J, Cannon B. The Browning of White Adipose Tissue: Some Burning Issues. *Cell Metabolism*. 2 sept 2014;20(3):396-407.
524. Ussar S, Griffin NW, Bezy O, Fujisaka S, Vienberg S, Softic S, et al. Interactions between gut microbiota, host genetics and diet modulate the predisposition to obesity and metabolic syndrome. *Cell Metabolism*. 2015;22(3):516-30.
525. Lee YT, Lin HY, Chan YWF, Li KHC, To OTL, Yan BP, et al. Mouse models of atherosclerosis: a historical perspective and recent advances. *Lipids in Health and Disease*. 17 janv 2017;16(1):12.
526. Poznyak VA, Grechko VA, Wetzker R, Orekhov NA. In Search for Genes Related to Atherosclerosis and Dyslipidemia Using Animal Models. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020;21(6).
527. Nguyen NT, Varela JE. Bariatric surgery for obesity and metabolic disorders: state of the art. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*. 1 mars 2017;14(3):160-9.