

Université de Montréal

**Dimorphisme sexuel dans les manifestations
métaboliques et cardiaques de la stéatose hépatique
non-alcoolique sans obésité révélée par l'étude d'un
nouveau modèle murin**

par

Charlotte Burelle

Faculté de Médecine

Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de
Maître ès sciences (M.Sc.)
en Sciences Biomédicales

Option sciences cardiovasculaires

14 octobre 2022

Université de Montréal

Faculté de Médecine

Ce mémoire intitulé

**Dimorphisme sexuel dans les manifestations métaboliques
et cardiaques de la stéatose hépatique non-alcoolique sans
obésité révélée par l'étude d'un nouveau modèle murin**

présenté par

Charlotte Burelle

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dre. May Faraj

(présidente-rapporteuse)

Dr. Matthieu Ruiz

(directeur de recherche)

Dr. Christopher Rose

(membre du jury)

Résumé

Les patients atteints de stéatose hépatique non alcoolique (NAFLD) développent fréquemment des manifestations cardiovasculaires. Bien que souvent liées à l'obésité, ces anomalies peuvent également se développer chez des patients non obèses atteints de NAFLD impliquant que cette pathologie hépatique joue, en soi, un rôle dans la pathogenèse des complications cardiaques.

Pour répondre à cette question et étudier les mécanismes sous-jacents indépendamment de toutes perturbations métaboliques et comorbidités préexistantes, nous avons utilisé un modèle murin arborant une déficience mitochondriale hépatique associée à un défaut d'assemblage du complexe IV de la chaîne respiratoire. Ce modèle murin avait préalablement été caractérisé au niveau hépatique mettant alors en évidence le développement d'une stéatose microvésiculaire et un profil lipidomique similaire à celui observé chez les patients atteints d'une NAFLD sans obésité. L'identification des mécanismes qui sous-tendent le développement et la progression de la NAFLD sans obésité et de ces répercussions extra-hépatiques ne faisant pas l'objet d'un très grand nombre d'études fondamentales, l'objectif principal était donc d'étudier l'axe foie-coeur.

Dans le cadre des travaux de ce mémoire, nous avons cherché à approfondir la caractérisation hépatique, préalablement faite à l'âge de 5 semaines et ayant fait l'objet de publications par des laboratoires collaborateurs. Nous avons par la suite investigué la glycémie, l'insulinémie et le profil des lipoprotéines plasmatiques pour finir par l'analyse du métabolisme et de la fonction cardiaque. L'ensemble de ces expériences ont été faites en prenant en compte l'impact non négligeable du sexe sur la physiopathologie de la NAFLD. Nos résultats ont dévoilé un important remodelage phénotypique sexe-dépendant allant au-delà des lésions hépatiques. Les mâles un peu plus que les femelles présentaient une hypoglycémie à jeun et une sensibilité accrue à l'insuline. Ils présentaient un léger dysfonctionnement diastolique soutenu par un remodelage des lipoprotéines circulantes et dans une certaine mesure, par un remodelage du lipidome cardiaque. À l'inverse, les femelles ne manifestaient aucun dysfonctionnement cardiaque, mais présentaient des déficiences cardiométaboliques soutenues

par une altération de l'intégrité et la fonction mitochondriale, un remodelage des lipoprotéines circulantes et une accumulation intracardiaque de triglycérides.

À la lumière de ces résultats, cette étude souligne que les défauts métaboliques dans le foie peuvent entraîner des anomalies significatives et dépendantes du sexe affectant à la fois le phénotype mitochondrial/métabolique et la fonction contractile indépendamment de l'obésité. Ce modèle expérimental pourrait s'avérer utile dans la compréhension des mécanismes sous-jacents à la variabilité liée au sexe dans la progression de la NAFLD chez l'homme non obèse.

Mots-clés : dimorphisme sexuel, maladies hépatiques, stéatose hépatique non alcoolique sans obésité, maladies cardiovasculaires, physiopathologie cardiaque, maladies métaboliques, métabolisme, dysfonction mitochondriale.

Abstract

Cardiac abnormalities often develop in patients with non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). Although frequently linked to obesity, these abnormalities can also develop in patients with lean-NAFLD, implying that the liver pathology *per se* plays a role in the pathogenesis of cardiac complications.

To address this question and investigate the underlying mechanisms independent of any pre-existent metabolic disruptions and comorbidities, we used a murine model of hepatic mitochondrial deficiency associated with a defect in the assembly of respiratory chain complex IV. This mouse model had previously been characterized at the hepatic level, showing the presence of microvesicular steatosis, and a lipidomic profile similar to that observed in patients with lean-NAFLD. Because few fundamental studies have addressed the identification of mechanisms underlying the development and progression of lean-NAFLD and its extrahepatic repercussions, the main aim was to study the liver-heart axis.

As a part of this master's project, we sought to deepen the hepatic characterization of this mouse model, previously done at 5-weeks of age, and published by collaborators. We then investigated glycemia, insulinemia and plasma lipoprotein profile, and finally examined cardiac metabolism and function. All these experiments were done in consideration of the non-negligible impact of sex on the pathophysiology of NAFLD. Our results unveiled a sex-dependent multi-faceted phenotypic remodeling that went beyond liver damage. Males, slightly more than females, showed fasting hypoglycemia and increased insulin sensitivity. They exhibited mild diastolic dysfunction supported by remodeling of the circulating lipoproteins, and to some extent remodeling of cardiac lipidome. Conversely, females did not manifest cardiac dysfunction, but exhibited cardiometabolic impairments supported by impaired mitochondrial integrity and function, remodeling of circulating lipoproteins, and intracardiac accumulation of triglycerides.

In light of these findings, this study underscores that metabolic defects in the liver can result in significant sex-dependent abnormalities that affect both the mitochondrial/metabolic phenotype and contractile function independent of obesity. This experimental model may prove useful to better understand the mechanisms underlying the sex-related variability in the progression of lean-NAFLD in humans.

Keywords : sexual dimorphism, liver diseases, lean non-alcoholic fatty liver disease, heart diseases, heart pathophysiology, metabolic diseases, metabolism, mitochondrial dysfunction.

Table des matières

Résumé	3
Abstract	5
Liste des tableaux	10
Liste des figures	11
Liste des sigles et des abréviations	17
Remerciements	21
Introduction	24
1. Stéatose hépatique non alcoolique.....	25
1.1. Histoire naturelle	25
1.2. Épidémiologie	26
1.3. Physiopathologie	27
1.3.1. Pathogenèse et progression	27
1.3.1.1. Métabolisme lipidique, lipotoxicité et résistance à l'insuline	27
1.3.1.2. Dysfonctionnement du tissu adipeux	29
1.3.1.3. Microbiote intestinal	31
1.3.1.4. Facteurs génétiques et épigénétiques	32
1.3.2. Manifestations extra-hépatiques.....	33
1.4. Défi de la dernière décennie : population mince et non obèse.....	33
1.4.1. Physiopathologie.....	34
1.4.2. Modèles expérimentaux	36
2. Implications des mitochondries hépatiques.....	37
2.1. Physiologie	37
2.1.1. Processus cataboliques	37
2.1.2. Dynamique mitochondriale	39
2.1.3. Adaptabilité mitochondriale.....	40

2.2. Atteintes mitochondriales dans la NAFLD	40
3. Impact du dimorphisme sexuel	42
4. Preuve de concept avec le modèle murin H- <i>Lrpprc</i> ^{KO}	45
4.1. Phénotype.....	47
5. Objectifs, hypothèses et méthodes expérimentales.....	47
First article. A Novel Genetic Mouse Model of Lean-NAFLD Unveils Sexual Dimorphism in the Liver-Heart Axis.....	50
Autorisations	51
6. Introduction	53
7. Materials and Methods.....	54
7.1. Animal model.....	54
7.2. Histology	54
7.3. Glucose metabolism.....	55
7.4. Total cholesterol in plasma lipoprotein profile	56
7.5. Cardiac function assessment using Millar catheterization.....	56
7.6. Cardiac untargeted lipidomic using LC-QTOF.....	57
7.7. RNA-sequencing analyses	57
7.8. Respirometry on isolated cardiac mitochondria.....	58
7.9. Molecular analyses	59
7.10. Statistical analyses	59
8. Results.....	60
8.1. Loss of hepatic LRPPRC does not lead to obesity.....	60
8.2. Loss of hepatic LRPPRC results in deleterious liver remodeling regardless of sex.....	62
8.3. Loss of hepatic LRPPRC induces disruptions in glucose metabolism in both sexes, but predominantly in males	65
8.4. Loss of hepatic LRPPRC leads to a remodeling of the cardiac lipidome .	69
8.5. Loss of hepatic LRPPRC induces mitochondrial remodeling mainly in females' hearts.....	70
8.6. Loss of hepatic LRPPRC causes impairment of cardiac diastolic function only in males	72
9. Discussion	75

9.1. Loss of hepatic LRPPRC induces advanced liver defects similar in both males and females	75
9.2. LRPPRC deficiency disrupts glucose metabolism predominantly in males	78
9.3. Hepatic loss of LRPPRC induces sex-dependent extra-hepatic manifestations	80
9.4. Conclusion.....	82
9.5. Limitations.....	82
10. Funding	83
11. Acknowledgements	83
12. Conflict of interest statement.....	83
13. Authors contribution	83
14. Supplementary data	85
References.....	88
Discussion et conclusion	93
15. Métabolisme lipidique et lipoprotéines	94
15.1. Métabolisme du cholestérol	94
15.1.1. Synthèse hépatique.....	94
15.1.2. Lipides, lipoprotéines et lipotoxicité cardiaque	96
15.2. Cortisol.....	99
16. Métabolisme du glucose	101
16.1. Implication du pancréas.....	102
16.2. Implication et impact sur les muscles squelettiques	103
16.3. Impact sur le muscle cardiaque	106
17. Hormones sexuelles	107
17.1. Oestrogènes	108
17.2. Testostérone.....	110
17.3. Hormone de croissance.....	110
Références bibliographiques	113

Liste des tableaux

1.1	Nombre d'études répertoriées sur la NAFLD avec ou sans obésité dans PubMed (en date du 7 octobre 2022). Le nombre d'études portant sur la NAFLD sans obésité et ces manifestations cardiovasculaires est également répertorié de même que le nombre d'études avec modèle animal (entré dans PubMed « <i>animal model</i> ») par requête.....	34
1.2	Principales caractéristiques des modèles animaux de NAFLD sans obésité couramment répertoriés dans la littérature (en date du 16 septembre 2022). <i>Methionine and choline deficient diet (MCD), Choline-deficient L-amino-defined (CDAA), High-Fat-High-Fructose (HF-HFD), Golgi membrane protein (GP73), High-Fat (HFD), sterol regulatory element-binding protein 1c (SREBP-1c), phosphatase and tensin homolog (PTEN), acyl-coenzyme A oxidase (AOX), patatin-like phospholipase domain-containing protein 3 (PNPLA3), Diglyceride acyltransferase 1/2 (DGAT1/2).</i>	38
9.1	List of murine oligonucleotides used for RT-qPCR.	85
9.2	Organ mass normalized to body weight (BW) in WT and Lrp1rc KO mice. Statistical analyses were performed using an ordinary two-way ANOVA, and data were corrected for multiple comparisons using, as recommended, Tukey's test (with a single pooled variance). Adj p-value: adjusted p-value. Significance was reached for: * Males WT vs Females WT, † Males KO vs Females KO. Related to figure 8.1.....	85
9.3	Transcripts significantly up- and down-regulated based of Log2(fold-change) in females KO vs. males KO. Related to figure 8.3.	86

Liste des figures

- 1.1 **Spectre d'évolution des stéatoses hépatiques non alcooliques (NAFLD).** La stéatose hépatique non alcoolique (NAFL) est présente chez environ 80% des patients avec une NAFLD et représente environ 20-30% de la population mondiale. L'évolution vers la stéatohépatite non alcoolique (NASH; ~11%) est associée à un risque d'évolution vers une NASH avec cirrhose. Le carcinome hépatocellulaire peut alors compliquer la cirrhose. Créée avec BioRender.com. Adapté de : Anty R, Canivet CM, Gual P, Tran A. Stéatoses hépatiques métaboliques: histoire naturelle, physiopathologie et démarche diagnostique. *Hépatogastro & Oncologie Digestive*. 2017-09-01;24(7):702-18. 25
- 1.2 **Hypothèse des « coups multiples parallèles » dans le développement et la progression de la NAFLD.** Abréviations: AGL; acides gras libres, DNL; lipogenèse *de novo*, NAFL; stéatose hépatique non alcoolique, NASH; stéatohépatite non alcoolique, RE; réticulum endoplasmique, ROS; espèces réactives de l'oxygène, TG; triglycérides, VLDL; *very low-density lipoprotein*. Créée avec BioRender.com. Adapté de : Buzzetti E, Pinzani M, Tsochatzis EA. *Metabolism*. 2016;65(8):1038-1048. 28
- 2.1 **Mécanisme simplifié de la chaîne respiratoire mitochondriale et de la synthèse d'ATP par phosphorylation oxydative.** Abréviations: CoQ; coenzyme Q, Cyt c; cytochrome C, FAD/FADH₂; Flavine adénine dinucléotide, NAD⁺/NADH; Nicotinamide adénine dinucléotide. Créée avec BioRender.com..... 39
- 3.1 **Aperçu de la pathogenèse de la NAFLD et ces différences entre les sexes.** L'impact connu des chromosomes et des hormones sexuels n'est pas représenté. Abréviations : AGL; acide gras libre, TG, triglycéride. Créée avec BioRender.com. Adaptée de : Lonardo, A et al. (2019), *Hepatology*. 2016;70:1457-1469..... 43
- 4.1 **Implication de la dysfonction mitochondriale dans la progression de la NAFLD dans la population souffrant d'obésité.** Abréviations: DNL;

lipogenèse *de novo*, TG; triglycéride , ROS; espèces réactives à l'oxygène.
Créée avec BioRender.com..... 46

8.1 **General phenotype in normal and liver-specific LRPPRC deficient mice.**

Immunoblots of **(A)** LRPPRC, and **(B)** MTCO1 content in the liver (n=8/group). Actin was used as loading control. **(C)** Mice weight and their **(D)** weight gain (in %) were taken and calculated once a week (N=40, 10/group). **(E)** Daily food intake, and **(F)** calorie assimilation represented by weight gain on daily caloric intake were also calculated once a week (n=10). **(G)** At 14 weeks of age, organ mass normalized to tibia length were calculated (n=10). The table represents the average mass for each group and organ. The adjusted p-value and the impact of sex and genotype are also shown. Difference between WT and KO mice was assessed with a two-way ANOVA following by Šidák (A-B, G) or Tukey (C-F) multiple comparison post hoc analysis : * $p < 0.05$, ** $p < 0.002$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. For panels C-F, significant differences between groups are symbolized: #, Male WT vs. Female WT; \$, Male KO vs. Female KO; *, Male WT vs. Male KO; %, Female WT vs. Female KO. Adj. p-value: adjusted p-value. 61

8.2 **Liver phenotype in normal and liver-specific LRPPRC deficient mice.**

(A) Representative images of HPS and Oil Red O stainings in livers from WT and KO mice. **(B)** Oil Red O staining area was quantified in hepatocytes from *Lrprrc* WT and KO livers (n=10/group). The activity of **(C)** aspartate and **(D)** alanine aminotransferases were measured (n=5-10/group), and several hepatic markers were quantified by RT- qPCR (n=9-10/group): **(E)** *Col1a1* for fibrosis, **(F)** *Mmp2* for matrix remodeling, **(G)** *Ccl2* and **(H)** *Tgfβ* for inflammation, **(I)** *Grp78* and **(J)** *Chop* for ER stress. **(K)** Circulating cortisol levels were quantified (n=6-10/group). Difference between WT and KO mice was assessed with a two-way ANOVA following by Šidák multiple comparison post hoc analysis : * $p < 0.05$, ** $p < 0.002$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. The source of variation is indicated below each graphs..... 65

8.3 **RNA-sequencing analysis in the liver and total cholesterol level in plasma lipoprotein fraction of normal and liver-specific LRPPRC deficient mice.**

The liver transcriptomic signature of **(A)** KO male and **(B)** KO female compared to their respective control (n=10). Transcripts were classified as down- (blue, cluster #1) or up-regulated (red, cluster #2) based

on their log₂ fold-change. For each comparison, the Cytoscape ClueGO plugin was used to cluster transcripts significantly enriched following enrichment analyses of GO terms (Molecular Function, Cellular Component, and Biological Process) and pathways (KEGG database). The size of the nodes reflected the statistical significance of the terms (pV). The node color showed the proportion of transcripts from each cluster that are associated to the term. Difference between WT and KO mice was assessed with a classical Fisher's exact test following by a Bonferroni step-down multiple comparison post hoc analysis. Only metabolic pathways with a pV ≤ 0.05 are shown here. Plasma from fed-mice at 14 weeks of age was pooled and subjected to gel filtration by FPLC. Total cholesterol in each lipoprotein fraction (total of 60) was measured in **(C)** males (n=4/group), and **(D)** females (n=4/group) mice..... 67

8.4 **Glucose metabolism in normal and liver-specific LRPPRC deficient mice.** **(A)** Blood glucose was monitored during 14 weeks, and insulinemia was quantified at (1) 9 and (2) 14 weeks (N=40, 10/group). **(B)** An ITT was performed at 11 weeks after a 5-hour fast to assess insulin sensitivity with the blood glucose curves (right), and the areas under the curves (left). **(C)** An OGTT was then performed at 12 weeks after a 16-hour fast to estimate the ability to secrete insulin in response to a bolus of glucose with the blood glucose curves (right), and the areas under the curves (middle). Insulinemia was measured before the test (T0), and 30 minutes after glucose administration (T30) (right). Difference between WT and KO mice was assessed with a two-way ANOVA following by Tukey (A) or Šidák (B-C) multiple comparison post hoc analysis : * p < 0.05, ** p < 0.002, *** p < 0.001, **** p < 0.0001. For panel A, significant differences between groups are symbolized: #, Male WT vs. Female WT; \$, Male KO vs. Female KO; *, Male WT vs. Male KO; %, Female WT vs. Female KO. The source of variation is indicated below each graphs..... 69

8.5 **Untargeted lipidomic in hearts of normal and liver-specific LRPPRC deficient mice.** **(A)** Immunoblot of LRPPRC content in the heart (n=10/group). Actin was used as loading control. **(B)** Volcano plot from LC-QTOF-based untargeted lipidomic of hearts from *Lrpprc* KO and control mice (n=7-8/group) depicting the 2214 MS features obtained following MS

data processing. The x axis corresponds to fold changes (FCs) of MS signal intensity values for all of these features in *Lrprrc* KO vs. control mice (log2). The y axis corresponds to the p values (-log10). Using a corrected p value (corrected P) threshold of 0.1 and 0.05 (horizontal red dotted lines), 162 MS features significantly discriminated *Lrprrc* KO from controls mice. See also supplementary table S9 for the list of lipids identified by MS/MS with FCs and p values (paired Student's t test followed by Benjamini-Hochberg correction). **(C-F)** Box plots of selected lipids significantly ($p\text{-corr} < 0.1$) discriminating KO from controls mice, and identified by MS/MS using LC-QTOF. Each dot represents a log2-transformed KO/WT signal intensity ratio (n=7-8/group) for the indicated lipid (sub)classes with their acyl side chain(s) – **(C)** glycerophospholipids : lysophosphatidylcholine (LPC) and phosphatidylcholine (PC) in green, lysophosphatidylethanolamine (LPE) and phosphatidylethanolamine (PE) in blue, **(D)** ether lipids, **(E)** cardiolipin (CL) 76:12, and **(F)** glycerolipids (triacylglycerol; TG). The underscore symbol “_” beside the acyl side chain for PCs, PEs, and TGs refers to acyl chains for which the sn position remains to be ascertained. Difference between WT and KO mice was assessed with a paired Student's t test: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ before and $p\text{-corr} < 0.05$ after Benjamini-Hochberg correction. Covariance analyses were performed to test the impact of sex, and are represented by colored squares under each lipid. 72

8.6 **Mitochondrial life cycle in hearts of normal and liver-specific LRPPRC deficient mice.** At 14 weeks of age, the gene expression of **(A)** *Tfam*, a mitochondrial biogenesis marker was quantified (n=8/group). Markers of mitochondrial **(B)** fission : (a) *Mff* and (b) *Drp1*, and (C) fusion : (a) *Mfn1*, (b) *Mfn2*, and (c) *Opa1* were also quantified (n=8/group). Difference between WT and KO mice was assessed with a two-way ANOVA following by Šidák multiple comparison post hoc analysis : * $p < 0.05$, ** $p < 0.002$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. The source of variation is indicated below each graphs. 73

8.7 **Mitochondrial fatty acid metabolism in hearts of normal and liver-specific LRPPRC deficient mice.** At 14 weeks of age, gene expression of several proteins involved in cardiac fatty acid metabolism were measured (n=8/group). **(A)** *Ppar α* , a nuclear receptor functioning as a transcription factor; **(B)** *Cd36*, *Cpt1b*, and *Cpt2*; 3 mitochondrial fatty acids

- (FAs) transporters; and **(C)** *Vlcad*, *Lcad*, and *Mcad*; enzymes implicated in mitochondrial β -oxidation. **(D)** Mitochondrial respiration in the presence of (a) palmitoyl-CoA and (b) palmitoyl-carnitine was also studied (n=6-8/group). Difference between WT and KO mice was assessed with a two-way ANOVA following by Šidák multiple comparison post hoc analysis : * $p < 0.05$, ** $p < 0.002$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. The source of variation is indicated below each graphs..... 75
- 8.8 Cardiac function studied by Millar probe in normal and liver-specific LRPPRC deficient mice. (A)** Parameters of blood pressure were measured in the right carotid artery (Pmax, maximum pressure; Pmin, minimum pressure) (n=8-10/group). Once entered into the left ventricle, parameters of systolic pressure were acquired (CT, contraction time; Pmax, maximum pressure; Pes, end-systolic pressure; MSP, mean systolic pressure; dPmax, maximum developed pressure) (n=8-10/group). Different parameters of diastolic pressure was also measured (n=8-10/group) and are represented by the **(B)** minimal pressure, **(C)** beginning diastolic pressure, **(D)** mean diastolic pressure, **(E)** end-diastolic pressure, **(F)** relaxation time, **(G)** myocardial relaxation index, and **(H)** Tau 1/2. **(I)** The ECG was monitored and the amplitude of the QRS complex was analyzed (n=8-10/group). Difference between WT and KO mice was assessed with a two-way ANOVA following by Šidák multiple comparison post hoc analysis : * $p < 0.05$, ** $p < 0.002$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. The source of variation is indicated below each graphs..... 77
- 14.1 Immunoblot analysis of Glycogen Synthase and PEPCK content in the liver of WT and *Lrpprc* KO mice.** Representative images and quantification (box plots; n=10) of **(A)** Glycogen Synthase (GS), and **(B)** PEPCK. Actin was used as loading control. Difference between WT and KO mice was assessed with a two-way ANOVA following by Šidák multiple comparison post hoc analysis: * $p < 0.05$, ** $p < 0.002$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. + : mean for each group..... 86
- 14.2 Fibrotic and lipidomic phenotype in the heart of WT and *Lrpprc* KO mice.** Several cardiac markers were quantified by RT-qPCR (n=9-10): **(A)** *Col1a1* and **(B)** *Col3a1* for fibrosis, and **(C)** *Tgf β 1* for inflammation. **(D)** Trichrome Masson staining area (in %) was quantified in hearts of *Lrpprc* WT

and KO mice (n=8), and **(E)** representative images were taking. Heatmaps selected lipids significantly ($p\text{-corr} < 0.1$) discriminating KO from controls mice, and identified by MS/MS using LC-QTOF. Each dot represents a log2-transformed KO/WT signal intensity ratio (n=7-8) for the indicated lipid (sub)classes with their acyl side chain(s) - **(F)** glycerophospholipids, and **(G)** ether lipids. The underscore symbol “_” beside the acyl side chain for PCs, PEs, and TGs refers to acyl chains for which the sn position remains to be ascertained. Difference between WT and KO mice was assessed with a paired Student’s t test: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ before and $p\text{-corr} < 0.1$ after Benjamini-Hochberg correction. Covariance analyses were performed to test the impact of sex, and are represented by colored squares under each lipid. Related to figures 8.5 and 8.8. 88

- 15.1 **Cartographie des gènes impliqués dans le métabolisme du cholestérol chez *Mus musculus*.** Issus de la base de données KEGG BRITE (#04979, Kanehisa Laboratories), les transcripts diminués chez la souris H-*Lrp1rc*^{KO} sont colorés en bleu pour les mâles et en jaune pour les femelles. Les flèches suivent le même code de couleur, montrant les concentrations des différentes fractions de lipoprotéines obtenues par FPLC. 95
- 15.2 **Lipides et protéines impliqués dans le métabolisme en contexte de lipotoxicité myocardiaque.** Adapté d’un modèle créé par Biorender en collaboration avec Anu Jose et Dr. Thomas Pulinilkunnil de la Dalhousie University. Créée avec Biorender.com. 98
- 16.1 **Origine des substrats utilisés pour maintenir les niveaux de glucose sanguin pendant le jeûne et la famine chez des volontaires souffrant d’obésité.** Adapté de Cahill, G.F., 2006. Fuel metabolism in starvation. *Annu. Rev. Nutr.* 26, 1–22. Créée avec Biorender.com.102
- 16.2 **Voies de la néoglucogénèse impliquant différents précurseurs non glucidiques tels que le pyruvate, le lactate, le glycérol et certains acides aminés.** Créée avec Biorender.com.104

Liste des sigles et des abréviations

ABCG8	ATP binding cassette subfamily G member 8
ABHD5	Abhydrolase Domain Containing 5
ACTH	Hormone adrénocorticotrope
ADP	Adénosine diphosphate
AG	Acides gras
AGL	Acides gras libres
AKT	Protein kinase B (PKB)
ALD	Hépatopathie alcoolique
ALT	Alanine aminotransférase
AMPK	AMP-activated protein kinase
AOX	acyl-coenzyme A oxidase
Apo	Apolipoprotéine
AR	Récepteurs aux androgènes
AST	Aspartate aminotransférase
ATP	Adénosine triphosphate
AUC	Aire en dessous de la courbe
BAT	Tissu adipeux brun
Cer	Céramides
CETP	Protéine de transfert des esters de cholestérol
CCL2	Chemokine ligand 2
CDAA	Choline-deficient L-amino-defined
CHC	Carcinome hépato-cellulaire
Chop	C/EBP homologous protein
ChREBP	Carbohydrate response element binding protein
CL	Cardiolipine
COL1A1	Collagène de type 1
CoQ	Coenzyme Q
CPT1	Carnitine palmitoyltransferase I
CPT1B	Carnitine Palmitoyltransferase 1B
CPT2	Carnitine palmitoyltransferase II
CR	Chylomicrons restants
Cyt c	Cytochrome C
DAG	Diacylglycerol
DGAT1/2	Diglyceride acyltransferase 1/2
DHA	Acide docosahexaénoïque

DLAL	Déficit en lipase acide lysosomale
DNL	Lipogenèse <i>de novo</i>
DRP1	Dynamin-related protein 1
Erα/β	Estrogen receptors alpha/beta
ERK1/2	Extracellular signal-regulated kinase 1/2
DT2	Diabète de type 2
ENPP1	Ectonucleotide pyrophosphatase/Phosphodiesterase 1
ETC	Chaîne de transport d'électrons
FAD/FADH2	Flavin adenine dinucleotide
FIS1	Fission, Mitochondrial 1
FPLC	Chromatographie liquide rapide des protéines
GCKR	Glucokinase (hexokinase 4) regulator
GH	Hormone de croissance
GL	Gouttelette lipidique
GLUT1/4	Glucose transporter protein 1/4
GPER1	G Protein-coupled estrogen receptor 1
GPL	Glycerophospholipides
GP73	Golgi protein 73
Grp78	Glucose regulated protein
GS	Glycogène synthase
GWAS	Genome-wide association study
HBL	Hypobetalipoprotéinémie
HDL	Lipoprotéine de haute densité
HF-HFD	High-fructose High-fat diet
HFD	High fat diet
HPS	Hematoxylin-Phloxine-Saffron
HSD17B13	Hydroxysteroid 17- β dehydrogenase 13
HSL	Lipase hormono-sensible
IC	Intervalle de confiance
IDL	Lipoprotéine de densité intermédiaire
IL	Interleukine
IMC	Indice de masse corporelle
ipGTT	Test de tolérance au glucose intrapéritonéal
IRS1	Insulin receptor substrate 1
ITT	Test de tolérance à l'insuline
KLF6	KLF transcription factor 6
LC-MS/MS	Chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem
LCAC	Long-chain acylcarnitine
LCAD	Long-chain Acyl-CoA dehydrogenase
LDL	Lipoprotéines de basse densité
LIPA	Lipase A
LPC	Lysophosphatidylcholine
LPE	Lysophosphatidylethanolamine
LPL	Lipoprotéine lipase
LRPPRC	Leucine rich pentatricopeptide repeat containing
MARC1	Mitochondrial amidoxime reducing component 1

MBOAT7	Membrane-bound O-acyltransferase 7
MCAD	Medium-chain acyl-CoA dehydrogenase
MCP	Membrane cofactor protein
MCVs	Maladies cardiovasculaires
MFF	Mitochondrial fission factor
MFN1/2	Mitofusin 1/2
MMP2	Matrix metalloproteinase-2
mTOR	Mechanistic target of rapamycin
MTTP	Microsomal triglyceride transfer protein
NAD⁺/NADH	Nicotinamide adénine dinucléotide
NAFL	Stéatose hépatique
NAFLD	Stéatose hépatique non alcoolique
NASH	Stéatohépatite
NF-κB	Nuclear factor- κ B
NRF-2	Nuclear factor erythroid 2-related factor 2
Ob-Rb	Récepteur à la leptine
OGTT	Test de tolérance oral au glucose
OPA1	Optic atrophy 1
ORO	Oil Red O
OVX	Ovariectomie
OXPHOS	Phosphorylation oxydative
PAS	Periodic acid-schiff
PC	Phosphatidylcholine
PE	Phosphatidylethanolamine
PEPCK	Phosphoénolpyruvate carboxykinase
PGC1α	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
PNPLA3	Patatin-like phospholipase domain containing 3
PPARα	Peroxisome proliferator activated receptor alpha
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
RE	Reticulum endoplasmique
ROS	Espèces réactives de l'oxygène
sdHDL/LDL	Petites particules de HDL ou LDL denses
SNP	Single nucleotide polymorphisms
SREBP	Sterol regulatory element-binding protein 1
TAC	Constriction de l'aorte transversale
TFAM	Mitochondrial transcription factor A
TG	Triglycéride
TGFβ	Transforming growth factor beta
TM6SF2	Transmembrane 6 superfamily member 2
TNFα	Tumor necrosis factor alpha
UCP2	Mitochondrial uncoupling protein 2
UPRmt	Mitochondrial unfolded protein response
VLCAD	Very long-chain acyl-CoA dehydrogenase
VLDL	Lipoprotéines de très basse densité
WAT	Tissu adipeux blanc
11β-HSD	11 β -hydroxysteroid dehydrogenase

*À mes souris, mes plus fidèles compagnonnes;
J'espère que ce projet sera à votre hauteur*

Remerciements

Je tiens à remercier mon superviseur, Dr Matthieu Ruiz. Je suis rentrée à la maîtrise en ne sachant pas trop où j'allais. À la fin de mon premier cycle en neurosciences, je suis venue te demander conseil alors que j'étais complètement perdue dans mon parcours universitaire. Je suis finalement sortie de là avec un sujet de maîtrise qui, depuis des années, me tenait tant à coeur. Sans vraiment savoir ce que je valais sur papier, tu m'as accueilli dans ton laboratoire. Aujourd'hui, c'est cette confiance que tu as mise en moi qui me permet de finir cette maîtrise. Ces deux dernières années ont été parsemées de hauts et de bas et bien que je ne l'exprime pas nécessairement, je suis extrêmement reconnaissante envers toi; envers ton enseignement, envers tes encouragements, ta compréhension et tes questionnements. On ne voyait pas toujours les choses du même oeil, mais ces dernières années m'ont permis de grandir autant personnellement que professionnellement.

Un petit clin d'oeil rempli de gratitude aux membres du consortium de recherche sur l'acidose lactique (Syndrome de Leigh, type canadien-français; LSFC). Même si ce projet n'était pas explicitement voué à cette cause, j'ai toujours réalisé nos expériences, analysé nos résultats et élaboré des pistes de réflexion en ayant une pensée pour les réunions auxquelles j'assiste depuis maintenant presque 14 ans d'abord en tant qu'enfant suivant son père chercheur et puis aujourd'hui, en tant qu'étudiante graduée. J'ai toujours admiré votre travail. Merci aux Dres Christine Des Rosiers, Sylvie Lesage et Chantal Bémour ainsi qu'au Dr Yan Burelle pour vos idées et votre appui à travers ce projet.

J'aimerais également remercier Dr Thierry Alquier présent sur mon comité de parrainage ainsi que les membres du programme NSERC-CREATE MATRIX (Metabolomics Advanced Training and International Exchange Program) pour leurs mentorats, leurs conseils et leurs encouragements, mais également pour toutes les opportunités de développement et perfectionnement en métabolomique et en bionformatique.

Impossible de passer à côté de ma copine de CAP ! Chloé, tu as été mon rayon de soleil dans les moments les plus sombres. Tu as été ma confidente, celle sur qui je pouvais compter à tout moment pour me vider le coeur. Merci d'avoir été présente même si aucun mot n'était prononcé. Merci de m'avoir par moment redonné le sourire. Tu es une femme remarquable et tu réussiras avec brio ce CAP plomberie.

Un grand merci à toi, Sonia, pour tout ce que tu m'as minutieusement appris, pour tes précieux conseils et encouragements, pour ton sens du perfectionnement qui m'a permis d'ancrer une rigueur scientifique et pour tes blagues qui font toujours décrocher un sourire. C'est toujours un plaisir de travailler en ta compagnie. Puisque nos chemins semblent se croiser plus d'une fois, j' imagine qu'on se recroisera avec plaisir un jour !

Je tiens à remercier la plateforme de métabolomique de l'ICM sans qui je n'aurais jamais pu découvrir les mystères des -omiques : Isabelle, Caroline, Anik, Bertrand et Julie. Une petite pensée pour Bertrand qui a dû prendre son mal en patience pour mettre en poudre quelques dizaines de foies stéatosés alors qu'ils étaient piégés dans de petits tubes. Promis, maintenant on va mettre ça dans de l'aluminium ! Merci à tous pour votre accueil, le partage de vos connaissances, ainsi que les bons moments passés ensemble malgré l'ambiance pandémique.

Je ne peux pas oublier la présence de ma chère amie Hiba. À toi qui as toujours réussi à me mettre dans tous mes états, merci d'être continuellement là pour moi (généralement avec 2-3 jours de retard !). Alors que tu as toujours les pieds sur terre, tu as souvent su m'arracher des nuages. Tu es une personne extraordinaire et une scientifique exceptionnelle. À ma partenaire de lab, à mon antipode, tu as été - et tu resteras - ma dose naturelle de 5-HT.

J'aimerais également exprimer toute ma reconnaissance envers mes parents. À mon papa; mon mentor, mon exemple d'humilité et de persévérance, celui en qui je vois la définition d'un scientifique qui aime profondément la connaissance. Tu as toujours su être là pour alimenter mes interrogations, pour m'orienter, me conseiller, m'épauler dans ma recherche, mais surtout au quotidien. Mon rêve d'enfant était de pouvoir partager avec toi mon amour pour la science et ma passion pour LSFC et c'est avec énormément de fierté qu'aujourd'hui je le concrétise. À ma maman; impossible de t'oublier. Bien que tu as arrêté de comprendre le 3/4 de ma recherche, ton support inconditionnel et ton dévouement sont deux choses parmi tant d'autres que je chéris. Tu es à bien des égards un exemple de résilience, de rigueur et de

perfectionnement. Une petite pensée à mes frères qui ont dû me supporter : merci pour votre compréhension et votre amour inconditionnel.

En avant dernier lieu, même si mon mémoire rend hommage à mes souris et j'aimerais encore une fois les saluer. Merci d'avoir été là pour faire avancer la recherche, merci d'avoir été là pour m'écouter, sans vraiment m'entendre et surtout sans avoir rien demandé, pendant des heures à l'animalerie. Sans vous, la science ne serait pas là où elle en est aujourd'hui.

Enfin je tiens à remercier les membres de notre laboratoire, nos collaborateurs et tous les organismes subventionnaires qui ont soutenu nos recherches par l'octroi de subventions au Dr Matthieu Ruiz (la Fondation de l'Institut de Cardiologie de Montréal, le Réseau de recherche sur la santé cardiométabolique, le diabète et l'obésité, les Fonds de Recherche du Québec, la Fondation des maladies du cœur du Canada et les Instituts de recherche en santé du Canada) et qui m'ont soutenu par l'octroi de bourses (NSERC CREATE MATRIX Training Program et l'Université de Montréal).

Introduction

Les lipides sont un groupe hétérogène de petites molécules hydrophobes ou amphipathiques comprenant diverses classes telles que les glycérolipides, les glycérophospholipides, les sphingolipides ou les lipides stérols [1]. Éléments constitutifs des membranes cellulaires, précurseurs pour les hormones et molécules importantes dans la production d'énergie, la signalisation cellulaire et la communication entre les organes, l'homéostasie lipidique nécessite un contrôle rigoureux. À cet effet, le maintien de l'homéostasie lipidique est assuré par une interaction étroite entre le système nerveux central et les tissus métaboliquement actifs tels que le tractus gastro-intestinal, le tissu adipeux et le foie permettant ainsi la coordination de l'absorption, de la distribution, du stockage et de l'utilisation des lipides à tous niveaux de l'organisation biologique [2].

Le foie joue un rôle imputable dans la régulation de la distribution des lipides dans l'organisme et cela en réponse au jeûne et à l'alimentation. Dans ce contexte, les hépatocytes synthétisent, stockent et sécrètent des lipides pour maintenir l'homéostasie lipidique. Dans des conditions physiologiques, ces processus ne peuvent qu'entraîner le stockage hépatique de petites quantités d'acides gras sous forme de triglycérides (TGs), dérivés de l'estérification du glycérol et des acides gras libres (AGLs), avec des teneurs en TGs inférieures à 5% à l'état d'équilibre [3]. Régulés par de nombreux facteurs tels que la disponibilité des substrats et les hormones métaboliques, cet état d'équilibre s'explique par le fait que les taux d'acquisition des AGLs par absorption à partir du plasma et par synthèse *de novo* dans le foie sont équilibrés par les taux d'oxydation des AGs et de sécrétion dans le plasma sous forme de lipoprotéines de très basses densités et enrichies en TG (VLDL-TG) [4]. Les quantités de TGs stockées dans le foie sont localisées dans des gouttelettes lipidiques (GLs) cytosoliques [5]. Cependant, un déséquilibre entre les taux de formation et de mobilisation des GLs et/ou la sécrétion de lipoprotéines peuvent conduire à une accumulation excessive de lipides. Cet état pathologique est plus connu sous le nom de stéatose hépatique non alcoolique (en anglais *non-alcoholic fatty liver diseases* (NAFLD)).

1. Stéatose hépatique non alcoolique

1.1. Histoire naturelle

La NAFLD se caractérise par la présence de vacuoles lipidiques au sein des hépatocytes et regroupe un spectre de dommages hépatiques chroniques et progressifs allant de la stéatose (en anglais *non-alcoholic fatty liver* (NAFL)) vers sa forme la plus sévère; la stéatohépatite non alcoolique (en anglais *non-alcoholic steatohepatitis* (NASH)) [6, 7]. Des complications débutant par la fibrose hépatique puis la cirrhose peuvent évoluer jusqu'au carcinome hépatocellulaire (CHC) et à l'insuffisance hépatique (Figure 1.1). Il est à noter que la consommation excessive d'alcool doit être exclue puisque les hépatopathies alcooliques (ALD) représentent à elles seules une catégorie de troubles hépatiques. Cependant, puisque ces atteintes dépassent la portée de la présente étude, nous n'allons que très brièvement en faire référence.

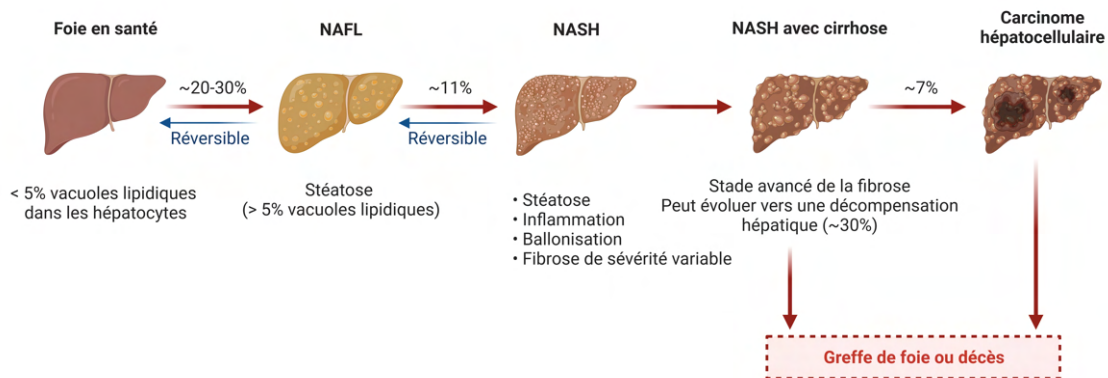


Fig. 1.1. Spectre d'évolution des stéatoses hépatiques non alcooliques (NAFLD).

La stéatose hépatique non alcoolique (NAFL) est présente chez environ 80% des patients avec une NAFLD et représente environ 20-30% de la population mondiale. L'évolution vers la stéatohépatite non alcoolique (NASH; ~11%) est associée à un risque d'évolution vers une NASH avec cirrhose. Le carcinome hépatocellulaire peut alors compliquer la cirrhose. Créée avec BioRender.com. Adapté de : Anty R, Canivet CM, Gual P, Tran A. Stéatoses hépatiques métaboliques: histoire naturelle, physiopathologie et démarche diagnostique. *Hépatogastro & Oncologie Digestive*. 2017-09-01;24(7):702-18.

La caractérisation précise d'une NAFLD nécessite une analyse histologique par biopsie du foie. Est alors appelé NAFL, la présence, dans les hépatocytes, de vacuoles lipidiques généralement macrovésiculaires excédant 5% de la masse totale du foie [8]. Cette proportion pouvant aller jusqu'à 50%, une hépatomégalie marquée est souvent observée. Considérée comme une évolution dans la physiopathologie de la NAFLD, la NASH est définie par la présence d'une stéatose de concert avec une constellation

de changements histologiques [9]. Chez une partie des individus, elle s'accompagne d'une nécro-inflammation, de signes de souffrance hépatocytaire sous la forme de ballonnement, d'inclusions cytoplasmiques (corps de Mallory-Denk) et d'un infiltrat inflammatoire variable et mixte [9]. Bien que non systématique, cette forme de la pathologie peut s'accompagner d'une fibrose de sévérité variable. Dans le cas d'une maladie progressive, la fibrose devient un obstacle à la reconstruction de lobules hépatiques sains ce qui aboutit à une régénération anarchique des hépatocytes formant alors des nodules de régénération. On parle alors de cirrhose micronodulaire. Chez le patient cirrhotique, le CHC complique souvent la pathologie affectant ainsi le pronostic. En effet, la NASH et ses complications sont actuellement la deuxième cause de transplantation hépatique aux États-Unis et d'ici 2025, annoncée comme la future première cause [10]. Par ailleurs, Younossi ZM et al. estiment que pour 1 000 personne-année, les taux d'incidence de la mortalité hépatique et de la mortalité globale chez les patients NASH seraient de 15,44 (IC 95% : 11,72 - 20,34) et 25,56 (IC 95% : 6,29 - 103,80), respectivement.

1.2. Épidémiologie

Il est estimé qu'environ 20% à 30% de la population adulte mondiale présente une NAFLD [11], cette estimation allant jusqu'à 90% chez les patients souffrant d'obésité morbide (obésité de classe III: $IMC \geq 40 \text{ kg/m}^2$) [12]. La prévalence de cette pathologie hépatique continue par ailleurs d'augmenter parallèlement à celle de l'obésité, atteignant les proportions d'une épidémie mondiale [10, 13, 14]. L'obésité n'est cependant pas le seul facteur de risque épidémiologique de la NAFLD. On retrouve notamment les changements socio-économiques, le mode de vie (e.g. sédentarité, manque d'activité physique, consommation de sucres raffinés, d'aliments transformés et ultra-transformés), certaines maladies métaboliques (e.g. obésité, diabète de type 2, dyslipidémie, résistance à l'insuline [15]), des facteurs génétiques, mais également le sexe, l'âge et l'origine ethnique [11]. Il est cependant important de noter que ces changements sont toujours en évolution. De ce fait, de nombreuses variables comme des événements épigénétiques sont à prendre en considération puisqu'ils expriment, avec le temps, les changements sociaux en phénomènes biologiques. Ces facteurs étant interconnectés de manière complexe dans la modulation de l'apparition et de la progression de la NAFLD [16], mieux comprendre la physiopathologie de cette pathologie apparaît donc primordial.

1.3. Physiopathologie

1.3.1. Pathogenèse et progression

Les mécanismes sous-jacents au développement et à la progression de la NAFLD sont complexes, multifactoriels, et toujours à l'étude. Différentes théories ont été élaborées en commençant par l'hypothèse des « 2 coups » (en anglais, 2 « *hits* ») émise pour la première fois en 1998 [17]. Selon cette théorie, l'accumulation intrahépatique de lipides secondaire à un mode de vie sédentaire, à une alimentation riche en gras, à l'obésité et à l'insulino-résistance, agirait comme premier coup sensibilisant alors le foie à diverses agressions. Constituant le « 2^e coup », ces agressions se présenteraient sous la forme de stress métaboliques (e.g. peroxydation lipidique induite par le stress oxydatif, lésions médiées par les cytokines) déclenchants au long terme, les cascades inflammatoires, la fibrogenèse et la stéatonecrose [18]. Grossièrement, le premier coup représenterait le développement de la NAFL, et le deuxième serait alors à l'origine de lésions hépatiques avec inflammation menant à la NASH. Depuis, ce modèle a été considéré comme une simplification excessive de la pathogenèse de la NAFLD où de nombreux facteurs agissent en synergie sur un fond, chez certains patients, de prédispositions génétiques. Aujourd'hui, la littérature met plutôt en avant l'hypothèse des « coups multiples parallèles » (en anglais, « *multiple parallel hits* ») [19, 20]. Selon celle-ci, les habitudes de vie et/ou les facteurs environnementaux et/ou génétiques associés à une obésité entraînent une augmentation des taux sériques d'AGLs et de cholestérol, le développement d'une résistance à l'insuline, la prolifération et le dysfonctionnement progressif des adipocytes ainsi que des modifications du microbiote intestinal (Figure 1.2). La NAFLD est d'ailleurs encore fréquemment reconnue comme étant la composante hépatique du syndrome métabolique [21, 22]. Un certain nombre de processus parallèles et divers contribuent au développement de la stéatose et de l'inflammation hépatiques. Cependant, afin de rester fidèles, mais succincts face à l'état actuel de la littérature, ces différents processus seront brièvement et séparément détaillés dans les prochaines sous-sections.

1.3.1.1. Métabolisme lipidique, lipotoxicité et résistance à l'insuline

L'insuline est une hormone anabolique essentielle au maintien de l'homéostasie glucidique et lipidique. À l'état postprandial, l'augmentation des taux circulants de glucose induit la sécrétion d'insuline par les cellules β pancréatiques. Une grande partie du glucose va alors être absorbée par les hépatocytes pour y subir la glycogénogenèse, voie métabolique permettant la synthèse de glycogène. Cependant, lorsque le

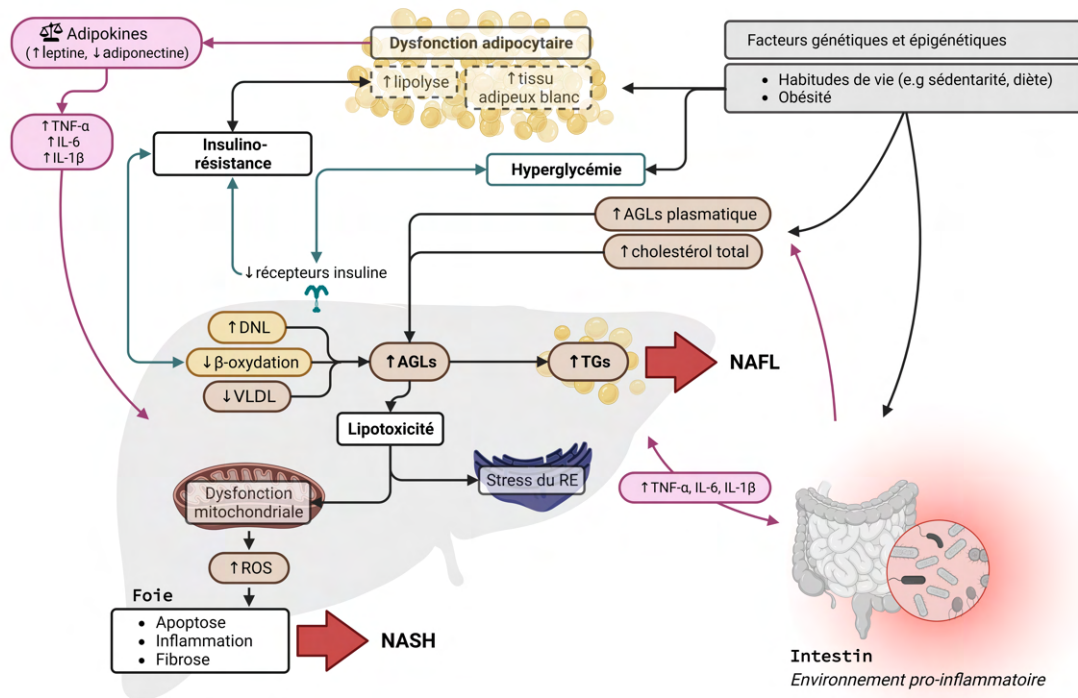


Fig. 1.2. Hypothèse des « coups multiples parallèles » dans le développement et la progression de la NAFLD. Abréviations: AGL; acides gras libres, DNL; lipogenèse *de novo*, NAFL; stéatose hépatique non alcoolique, NASH; stéatohépatite non alcoolique, RE; réticulum endoplasmique, ROS; espèces réactives de l'oxygène, TG; triglycérides, VLDL; *very low-density lipoprotein*. Créée avec BioRender.com. Adapté de : Buzzetti E, Pinzani M, Tsochatzis EA. *Metabolism*. 2016;65(8):1038-1048.

foie devient saturé en glycogène, tout glucose supplémentaire absorbé par les hépatocytes sera dévié vers des voies conduisant à la synthèse d'acides gras, communément appelée lipogenèse *de novo* (DNL), qui seront alors estérifiées en TGs pour être exportées sous forme de VLDL-TG en périphérie vers, entre autres, le tissu adipeux [23]. En amont, les récepteurs à l'insuline et le glucose médient ces processus via l'activation hépatique de facteurs de transcription (e.g. insulino-dépendant: SREBP-1c, SREBP-2; glucose-dépendant: ChREBP) [24, 25, 26]. Au niveau du tissu adipeux, l'insuline freine la lipolyse en inhibant l'enzyme régulant la libération des AGLs; la lipase hormono-sensible (HSL) [27]. Évidemment, pour s'assurer d'atteindre l'euglycémie dans les meilleurs délais, l'insuline inhibe parallèlement la gluconéogenèse et la glycogénolyse tout en augmentant le taux d'absorption du glucose principalement dans les muscles squelettiques et le tissu adipeux. Par conséquent, à l'échelle de l'organisme, l'insuline incite la plupart des cellules à oxyder préférentiellement les glucides au détriment des acides gras afin de produire de l'énergie.

La résistance à l'insuline semble être une caractéristique fondamentale de la NAFLD et est plus fréquente dans la NASH que dans la NAFL [28, 29, 30]. Cet état se produit lorsque les taux sanguins usuels d'insuline sont insuffisants pour réguler les voies métaboliques clés dans le foie, tissu adipeux et/ou les muscles squelettiques. La NAFLD ayant été depuis longtemps associée à la présence du syndrome métabolique ou du diabète de type 2 (DT2) [21], il a été montré que l'hyperglycémie entraînait une surexpression de ChREBP favorisant ainsi l'accumulation intrahépatique d'acides gras via une stimulation accrue de la DNL hépatique [31]. Une étude menée chez les humains a d'ailleurs révélé que dans la NAFLD, environ 25% du pool total de lipides hépatiques provenaient de la DNL hépatique [23]. L'insulino-résistance a également été associée à une diminution de l'expression des récepteurs à l'insuline [32] et à une inhibition de la β -oxydation mitochondriale favorisant ainsi l'accumulation de lipides hépatiques notamment sous forme de TGs [33]. De nombreuses autres altérations telles que l'induction d'un stress du réticulum endoplasmique (RE), la sécrétion de cytokines et l'activation d'inflammasomes, ont été corrélées au développement et à la progression de la NAFLD et ont été passées en revue par Buzzetti, E et al. [19]. Considéré comme l'un des « coups multiples » prédisposant les patients au développement et/ou à la progression de la NAFLD, la résistance à l'insuline est critique pour l'établissement et la pérennité du stress oxydatif, de l'activation de cascades inflammatoires et de l'effet délétère des lipides s'accumulant de manière intracellulaire et conduisant à l'apoptose (communément appelé « lipotoxicité ») [34].

1.3.1.2. Dysfonctionnement du tissu adipeux

Le dysfonctionnement du tissu adipeux blanc constitue une avenue majeure dans la physiopathologie de la NAFLD avec obésité. En effet, un stockage accru des triglycérides dans les adipocytes précède et facilite l'hypertrophie et la prolifération adipocytaire. Au long terme et tel qu'illustré par le nombre accru de macrophages dans le tissu adipeux [35] et l'augmentation des niveaux plasmatiques de cytokines inflammatoires [36], un état inflammatoire chronique de bas grade s'installe. En effet, les adipocytes hypertrophiés sécrètent des quantités accrues de substances chimio-attractives (e.g. MCP1, IL-8) attirant de ce fait les monocytes dans le tissu adipeux où ils se différencient en macrophages. Ceci est bien démontré par le nombre de macrophages dans le tissu adipeux qui représente 5 à 10% du nombre total de cellules chez les individus sains, mais qui augmente jusqu'à 50% chez les individus souffrant d'obésité [35]. D'ailleurs, les macrophages s'infiltrant dans le tissu adipeux ont un phénotype M1, sécrétant des cytokines inflammatoires (e.g. TNF- α , IL-1) [37]. L'hypertrophie des adipocytes amène par le fait même à un changement de la polarisation des macrophages en promouvant le phénotype M1 au profit du phénotype M2, ces derniers

sécrétant des cytokines anti-inflammatoires (e.g. IL-10) [37, 38]. Les cytokines pro-inflammatoires libérées par les macrophages M1 augmentent ainsi la lipolyse et la résistance à l'insuline dans l'adipocyte créant une boucle de rétroaction positive avec une inflammation et un dysfonctionnement tissulaire croissants. Cet environnement pro-inflammatoire a également un impact sur la fonction endocrinienne du tissu.

Les adipokines, dont la leptine et l'adiponectine, sont des hormones sécrétées par les adipocytes et capables d'agir à la fois au niveau local et systémique. La leptine est une hormone anorexigène et pro-inflammatoire qui prévient l'accumulation de TGs dans les adipocytes et les tissus non adipeux. Dans le foie, ceci est réalisé par la diminution de l'expression de SREBP-1c [39] supprimant ainsi la néoglucogenèse et la DNL. En canalisant les AGLs vers leurs oxydations plutôt que vers leurs stockages, la leptine préserve également la sensibilité à l'insuline au niveau musculaire. Via son principal récepteur (Ob-Rb), la leptine entraîne l'expression de gènes suppresseurs de la signalation des cytokines agissant comme une boucle de rétroaction négative en inhibant la production de leptine et la signalisation de l'insuline [40]. L'adiponectine est, quant à elle, un sensibilisant à l'insuline possédant des activités anti-inflammatoires (e.g. inhibition de NF- κ B et de la sécrétion de IL-6 et TNF- α ; sécrétion de cytokines anti-inflammatoires [41]) et hépato-protectrices [42]. Elle prévient entre autres l'accumulation de lipides hépatiques en diminuant la néoglucogenèse, l'influx d'AGLs et la DNL hépatique (via l'inhibition de SREBP-1c entre autres) tout en favorisant la β -oxydation mitochondriale, entraînant une réduction de la teneur en TGs hépatiques [43]. De plus, à l'inverse de la leptine, l'adiponectine agit sur les cellules stellaires et les cellules de Kupffer en exerçant une action anti-inflammatoire et anti-fibrotique via la suppression entre autres des cytokines pro-inflammatoires (e.g. TNF- α et IL-6) et en induisant celles anti-inflammatoires (e.g. IL-10).

Cependant, une dérégulation des adipokines constitue un lien essentiel entre l'obésité, la résistance à l'insuline et l'inflammation, mais également la NAFLD en favorisant la dyshoméostasie glucidique et lipidique [30, 44]. Dans la pathogenèse de la NAFLD, les taux de leptine et d'adiponectine sont déséquilibrés [43, 45] et se traduisent par une augmentation des niveaux de leptine et d'une diminution des niveaux d'adiponectine. De ce fait, l'augmentation soutenue des taux sériques de leptine favorise la lipotoxicité, la régulation à la hausse des cytokines pro-inflammatoires, et la résistance à l'insuline en provoquant l'inhibition de la β -oxydation, l'augmentation de la DNL hépatique via SREBP-1c [46, 47] et en modifiant la sensibilité des adipocytes à l'action inhibitrice que l'insuline exerce sur la lipolyse [48, 49, 50]. De plus, la leptine, important facteur dans la fibrogenèse hépatique, active les cellules de Kupffer puis les cellules stellaires [51, 52, 53] favorisant la progression vers un état fibrotique.

Au long terme, l'hypertrophie des adipocytes et/ou la une résistance à l'insuline alimente la dérégulation des adipokines et vis-versa, entretenant le cercle vicieux d'un tissu adipeux inflammé et donc dysfonctionnel [54, 55, 56].

Les modifications dans la fonction endocrine du tissu adipeux se traduisent éventuellement par des altérations des lipides plasmatiques. En effet, l'augmentation de la lipolyse entraîne une élévation des niveaux circulants d'AGLs, exacerbant de ce fait la sécrétion hépatique de VLDL-TG [57]. En outre, la résistance à l'insuline entraîne une production accrue de TGs et inhibe la dégradation d'apoB, se traduisant ainsi par une production et une sécrétion accrue de VLDL ainsi qu'une augmentation des TGs à l'état postprandial [58] mais également une diminution de leurs clairances [59, 60, 61]. Selon la littérature, cela pourrait s'expliquer entre autres par une diminution, à l'état postprandial, de l'activité hydrolytique de la lipoprotéine lipase (LPL), notamment modulée par l'action stimulante, mais obsolète de l'insuline [62]. Pour finir, le métabolisme lipidique est également influencé par la protéine de transfert des esters de cholestérol (CETP) dont l'action permet le transfert des TGs provenant des VLDL et chylomicrons vers les lipoprotéines de haute et de basse densité (HDL et LDL respectivement) qui échangent leurs esters de cholestérol [60, 63]. Dans le cadre d'une adiposopathie tel que la NAFLD avec obésité, la fonction de CETP est augmentée induisant ainsi i) la formation de petites particules de HDL denses (sdHDL) alors moins fonctionnelles et plus facilement éliminées par les reins et ii) la formation de petites particules de LDL denses (sdLDL) dont la clairance est diminuée mais qui confèrent un risque accru d'évènements athérogènes mais également la NAFLD [60, 63].

1.3.1.3. Microbiote intestinal

De plus en plus de preuves suggèrent que le microbiote intestinal joue un rôle essentiel dans la pathogenèse de la NAFLD. Reconnu comme étant l'axe intestin-foie, cette communication bidirectionnelle agit de telle sorte que les facteurs dérivés du foie comme les acides biliaires influencent la composition et la fonction du microbiote intestinal et que les métabolites dérivés de l'intestin, qu'ils soient alimentaires ou microbiens, bénéfiques ou nocifs, régulent la synthèse des acides biliaires ainsi que le métabolisme hépatique du glucose et des lipides [64]. Chez les patients atteints d'une NAFLD, plusieurs études mettent de l'avant un remplacement des microbes bénéfiques par des microbes néfastes, entraînant le développement d'un environnement intestinal pro-inflammatoire et métaboliquement toxique avec pour conséquence un dysfonctionnement de la barrière intestinale, l'exposition du foie à des facteurs alimentaires et dérivés du microbiote, et la progression de la NAFLD [65]. À ceci s'ajoute

une diminution de la diversité du microbiote. Les facteurs dérivés de l'intestin et impliqués dans la pathogenèse de la NAFLD peuvent provenir de l'alimentation (e.g. éthanol, édulcorants contenant du fructose, choline via sa conversion par le microbiote), être un produit du microbiote (e.g. composants microbiens, produits du métabolisme du microbiote) ou être dérivés du patient atteint (e.g. altération du métabolisme des sels biliaires). Cependant, à savoir si la dysbiose est une cause directe de la NAFLD ou si elle reflète simplement les changements associés à la maladie dans les systèmes immunitaire et métabolique du patient reste à être étudié. Certaines études précliniques et cliniques suggèrent cependant que la dysbiose du microbiote intestinal joue un rôle clé dans le déclenchement et le maintien de la maladie.

1.3.1.4. Facteurs génétiques et épigénétiques

Des preuves de plus en plus nombreuses suggèrent que la génétique et l'épigénétique jouent un rôle fondamental dans l'initiation et la progression de la NAFLD. Plusieurs études ont identifié des variations de séquences génomiques associées à un risque accru de pathologie hépatique chronique, risque fortement amplifié par l'obésité et le mode de vie.

Tout d'abord, des études cas-témoins et transversales ont permis d'identifier des variants significativement associés à la prédisposition au développement et/ou la progression de la NAFLD dont certains étaient causaux dans l'expression phénotypique de la NAFLD [66]. De manière généralement, ces variants étaient associé au remodelage des GLs (e.g. *PNPLA3*), à la sécrétion des VLDL (e.g. *TM6SF2*, *APOB*, *MTTP*), à la régulation de la DNL hépatique (e.g. *GCKR*, *KLF6*) et aux voies de signalisation de l'insuline (e.g. *ENPP1*, *IRS1*). Plusieurs de ces gènes ont été confirmés par des études d'association pangénomique GWAS [67]. De nombreux autres gènes candidats et variants ont été mis en évidence, mais ne semblent pas tous directement liés à l'expression phénotypique de la NAFLD (e.g. facteurs prédisposant à l'insulinorésistance ou au dysmétabolisme) [66, 67, 68, 69].

Toutefois, l'interaction du bagage génétique avec les facteurs environnementaux est tout autant cruciale dans la physiopathologie. La littérature suggère de plus en plus que l'épigénétique traduit les altérations du métabolisme et des nutriments en un modèle héréditaire d'expression génétique [66, 67]. Par exemple, la consommation d'une diète riche en gras chez la souris gestante a contribué à la progression de la NAFLD chez sa progéniture adulte, qui était associée, dès le plus jeune âge, à une résistance à l'insuline et une augmentation de la masse du tissu adipeux viscéral [70]. Avec l'âge, l'accumulation hépatique de triglycérides était beaucoup plus sévère et la progéniture développait des signes d'une NASH. Cependant, le rôle de l'épigénétique dans la pathogenèse de la NAFLD n'est pas encore bien caractérisé.

1.3.2. Manifestations extra-hépatiques

Avec la contribution non négligeable de plusieurs facteurs de risques tels que ceux mentionnés dans les sections précédentes, la NAFLD chez la population souffrant d'obésité peut, avec le temps, avoir de nombreuses manifestations extra-hépatiques et notamment cardiovasculaires [71]. La littérature à ce sujet est abondante : les patients vont généralement présenter une dysfonction diastolique et une hypertrophie cardiaque conférant alors un risque accru de cardiomyopathies [72, 73, 74, 75, 76, 77]. Ils peuvent également présenter des calcifications valvulaires [78, 79]. Chez les patients atteints de NAFLD, ces anomalies fonctionnelles, attribuables à des altérations du métabolisme énergétique et de la perfusion myocardique, sont à leurs tours des facteurs de risque pour les arythmies cardiaques [80, 81]. La littérature met également de l'avant certains défauts de conduction (e.g bloc auriculoventriculaire du premier degré, bloc de branche droit ou hémibloc antérieur gauche) [82, 83] ainsi qu'une prédisposition à l'athérosclérose coronarienne accélérée [71]. À terme, ces manifestations cardiaques facilitent l'arrivée progressive d'une insuffisance cardiaque qui demeure aujourd'hui un problème de santé publique mondiale avec une prévalence estimée à 64,3 millions de personnes atteintes [84, 85].

1.4. Défi de la dernière décennie : population mince et non obèse

Bien qu'il soit connu que la plupart des patients atteints d'une NAFLD sont obèses, une récente méta-analyse dénote qu'environ 40% de la population adulte mondiale atteinte d'une NAFLD ne souffrent pas d'obésité et que près d'un patient sur cinq est considéré comme mince (IMC < 25 kg/m²; Asie : IMC < 23 kg/m²) [86]. De plus, les études épidémiologiques décrivent ces patients comme étant le plus souvent des hommes, plus âgés, ayant un plus grand tour de taille que les patients non obèses sans NAFLD, mais présentant des anomalies métaboliques moins importantes que les patients en surpoids ou souffrant d'obésité avec NAFLD [87]. Il est également important de noter que jusqu'à 8% des adolescents non obèses peuvent être atteints de NAFLD [88], bien que ce chiffre reste nettement inférieur à la prévalence chez les adolescents en surpoids ou souffrants d'obésité [89].

Malgré ces chiffres alarmants, ce sujet est encore trop peu exploré : le nombre d'études sur la NAFLD sans obésité reste limité (sur PubMed : 7 199 résultats vs 122 résultats sur la NAFLD sans obésité) et les manifestations extra-hépatiques et notamment cardiovasculaires ne sont pas très bien répertoriées avec un peu moins de 25 résultats sur PubMed [90] (Tableau 1.1). D'ailleurs, les thérapies actuellement disponibles et efficaces pour traiter la NAFLD chez ces patients le démontrent

: elles impliquent des changements d'habitudes de vie (e.g. remaniement des habitudes alimentaires, style de vie moins sédentaire) mais l'accessibilité à ces ressources reste limitée avec notamment une faible proportion de programmes personnalisés [6, 91, 92]. Quant aux stratégies pharmaceutiques, bien que plusieurs médicaments pour le traitement de la NAFLD aient été développés dans des essais cliniques de phase III, aucun d'entre eux n'a été étudié chez les patients non-obèses atteints de NAFLD [6, 92]. En outre, les études sur la mortalité suggèrent que la NAFLD sans obésité présente un risque de mortalité similaire (patients souffrant d'obésité: 27,2% vs non obèses: 8,3%; p=0,190 [93]) voire supérieur (sur 15 ans, patients souffrant d'obésité: 11,9% vs non-obèses: 51,7% [94]) à la NAFLD avec surpoids ou obésité [93, 95, 96]. Avec le manque d'accessibilité aux données malgré l'urgence de la situation, il est donc primordial de mieux comprendre la physiopathologie de la NAFLD sans obésité et ses conséquences cardiaques.

Requête dans PubMed	Nombre d'études (années)	
	Total	Avec modèles expérimentaux
((nafld[Title/Abstract]) OR (nafld[Text Word])) AND ((obesity[Title/Abstract]) OR (obesity[Text Word]))	7 199 (1993-2022)	710 (2001-2022)
((lean nafld[Title/Abstract]) OR (lean nafld[Text Word]))	122 (2011-2022)	4 (2020-2022)
((lean nafld[Title/Abstract]) OR (lean nafld[Text Word])) AND ((cardiovascular[Title/Abstract]) OR (cardiovascular[Text Word]))	22 (2016-2022)	1 (2022)

Tableau 1.1. Nombre d'études répertoriées sur la NAFLD avec ou sans obésité dans PubMed (en date du 7 octobre 2022). Le nombre d'études portant sur la NAFLD sans obésité et ces manifestations cardiovasculaires est également répertorié de même que le nombre d'études avec modèle animal (entré dans PubMed « *animal model* ») par requête.

1.4.1. Physiopathologie

Les personnes non obèses atteintes de NAFLD représentent très probablement un groupe hétérogène de diagnostics moléculaires. En 2021, Sílvia Vilarinho et al. ont cherché à mieux cerner la NAFLD sans obésité en proposant deux grands sous-types basés sur l'épidémiologie, l'histoire naturelle et le pronostic [97]. La NAFLD de type 1 surviendrait donc chez les patients présentant une adiposité viscérale et une résistance à l'insuline, mais un IMC normal (< 25-23 kg/m²), et la NAFLD de type 2, chez les patients présentant une stéatose hépatique résultant d'un trouble monogénique.

Dans la NAFLD de type 1, la pathogenèse est probablement similaire à celle des patients en surpoids ou obèses souffrant de NAFLD c'est-à-dire déterminée par un apport calorique excessif, en particulier des glucides simples, et un mode de vie sédentaire, entraînant une stéatose hépatique et une lipotoxicité [98]. Cependant, comparée aux témoins sains, l'adaptabilité métabolique de ces patients est plus faible, suggérant une plus forte corrélation avec des facteurs de risque génétiques [99]. L'impact cumulatif de polymorphismes associés à la NAFLD pourrait donc contribuer à la manifestation et à la progression de la maladie malgré un IMC inférieur [100, 101]. On peut de ce fait énumérer :

- Le variant p.I148M dans le gène *PNPLA3* (*patatin-like phospholipase domain containing 3*) codant pour l'adiponutrine, une triglycéride lipase affectant l'hydrolyse des TGs dans les adipocytes, et qui confère de ce fait un risque accru de stéatose hépatique, NASH, cirrhose et CHC [102, 103, 104]. L'augmentation de l'IMC amplifie par ailleurs l'effet de ce polymorphisme sur la stéatose et sa progression vers la cirrhose [105]. Cet effet est également observé lors de la consommation de diètes riches en saccharose [106].
- Le variant p.E167K dans le gène *TM6SF2* (*transmembrane 6 superfamily member 2*). Jouant un rôle majeur dans la biosynthèse du cholestérol hépatocellulaire et dans la régulation des gènes liés son métabolisme, la présence de ce variant augmente la susceptibilité à la NAFLD en empêchant l'assemblage normal des VLDL [107]. Les études d'association pangénomique démontrent également une association avec un IMC et une adiposité plus faibles [108], suggérant que le variant p.E167K peut jouer un rôle important chez les individus non obèses atteints de NAFLD. Dans les modèles animaux, ce variant peut provoquer une stéatose hépatique dans le cadre d'un régime alimentaire normal [109], mais peut être exacerbé par des régimes riches en gras et en fructose [110].
- Autres variants. Des polymorphismes dans le gène *MBOAT7* (*membrane-bound O-acyltransferase domain-containing protein 7*) et *GCKR* (*glucokinase (hexokinase 4) regulator*) ont également été associés, mais de façon plus modeste, à la NAFLD [111]. À l'inverse, des variants dans les gènes *HSD17B13* (*7 β -Hydroxysteroid dehydrogenase type 13*) [112] et *MARC1* (*Mitochondrial amidoxime-reducing component 1*) [113, 114] ont démontré avoir des effets protecteurs contre la sévérité de la maladie hépatique, mais l'évaluation de l'interaction avec l'adiposité nécessite une étude plus approfondie.

Quant à la NAFLD de type 2, les patients atteints ne présentent pas d'adiposité viscérale, mais présentent une pathologie résultant d'un trouble monogénique rare qui, dans certains cas, peuvent faire l'objet de traitements ciblés. La littérature met de l'avant plusieurs troubles monogéniques tels que :

- L'hypobétalipoprotéinémie (HBL). L'HBL constitue un groupe de pathologie du métabolisme des lipoprotéines causée par des mutations de perte de fonction à l'état hétérozygote ou homozygote dans l'apolipoprotéine B (*APOB*) [115]. Le phénotype est caractérisé entre autres par une malabsorption des lipides pouvant entraîner de faibles taux de lipides circulants et une stéatose hépatique. Contrairement aux patients atteints du syndrome métabolique, ces patients ont généralement des profils lipidiques à jeun démontrant de faibles niveaux de triglycérides, d'apoB et de cholestérol LDL circulant.
- Des mutations monoalléliques de l'*ABHD5* (*Abhydrolase Domain Containing 5, Lysophosphatidic Acid Acyltransferase*), entraînant une insuffisance de sa protéine éponyme, sont impliquées dans une forme héréditaire rare de NAFLD en raison d'une déficience du métabolisme des lipides neutres [116].
- Le déficit en lipase acide lysosomale (DLAL) est une maladie autosomique récessive résultant de mutations de perte de fonction de la lipase A (*LIPA*), qui entrave l'hydrolyse des esters de cholestérol et des triglycérides, entraînant son accumulation entre autres dans les hépatocytes [117]. De ce fait, les patients présentant un déficit en LIPA peuvent développer une stéatose hépatique et un dysfonctionnement progressant vers une cirrhose associée à une dyslipidémie.
- Les syndromes lipodystrophiques englobent un spectre de maladies caractérisées par une perte sélective du tissu adipeux, plusieurs formes étant associées à un dépôt de lipides ectopique dans les tissus viscéraux tels que le foie [118, 119]. La manifestation hépatique la plus courante de la lipodystrophie est de ce fait la NAFLD.

Plusieurs troubles monogéniques mitochondriaux associés à un phénotype de NAFLD sans obésité ont également été rapportés dans plusieurs études de cas et seront discutés dans la prochaine section. Malgré la présence croissante d'études sur la NAFLD chez l'humain non obèse, peu d'études s'intéressent aux mécanismes physiopathologiques qui sous-tendent les manifestations métaboliques et fonctionnelles de la NAFLD et de ces répercussions extra-hépatiques notamment cardiovasculaires (Tableau 1.1, ligne 3). De ce fait, des modèles expérimentaux appropriés doivent être utilisés afin d'élucider les mécanismes physiopathologiques détaillés de la NAFLD et notamment le rôle des mitochondries.

1.4.2. Modèles expérimentaux

Les causes pathologiques de la NAFLD humaine étant nombreuses, il est difficile d'établir un modèle expérimental universel. Ainsi, plusieurs modèles génétiques, nutritionnels (induits par le régime alimentaire) et autres modèles de souris, de rats et de

cochons d'Inde ont été établis [120, 121, 122]. Les différents modèles couramment présents dans la littérature et leurs principales caractéristiques sont présentés dans le tableau 1.2. Bien que ces modèles permettent de mieux cerner la pathogenèse et les conséquences périphériques d'une NAFLD sans obésité, aucun de ces modèles – dans ce contexte – n'implique spécifiquement les mitochondries.

2. Implications des mitochondries hépatiques

2.1. Physiologie

Responsable de la régulation d'un certain nombre de processus biologiques, le foie exige des besoins énergétiques excessifs. Par conséquent, la présence de mitochondries opérationnelles dans les hépatocytes est indispensable.

2.1.1. Processus cataboliques

Impliquées dans divers processus cataboliques, à savoir la β -oxydation et le cycle de Krebs, les mitochondries ont pour principales fonctions physiologiques la génération d'énergie sous forme d'adénosine triphosphate (ATP) ainsi que la production de métabolites. Brièvement, plusieurs métabolites cellulaires tels que le pyruvate, issu de la glycolyse, les acides aminés et les AGs alimentent le cycle de Krebs dans la matrice mitochondriale [123]. Le cycle de Krebs génère les équivalents réducteurs nicotinamide adénine dinucléotide (NADH) et flavine adénine dinucléotide (FADH₂), qui transfèrent alors, par oxydation, leurs électrons à la chaîne de transport des électrons (ETC) composé de quatre complexes multi protéiques (Figure 2.1). Le transfert des électrons à travers l'ETC est couplé au pompage d'ions hydrogène de la matrice vers l'espace intermembranaire par les complexes I, III et IV permettant, avec l'oxydation des donneurs d'électrons par l'ETC, la phosphorylation de l'ADP en ATP par le complexe V (ou ATP synthétase). Ce processus biologique est connu sous le nom de phosphorylation oxydative (OXPHOS). Il est important de noter qu'au cours de ce processus, un certain pourcentage de l'oxygène consommé par la mitochondrie est converti en superoxyde et en hydrogène, également connu sous le nom d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), ce qui contribue aux lésions mitochondriales dans de nombreuses pathologies métaboliques [124]. Par ailleurs, en plus de générer du NADH et du FADH₂, le cycle de Krebs génère également des intermédiaires qui peuvent être canalisés vers de multiples voies métaboliques biosynthétiques afin de produire entre autres du glucose, des acides aminés et des lipides [123].

Modèle de NAFLD	Poids	Profil métabolique	Histologie hépatique	Sexe	PMID
Modèles induits par la diète					
Souris FVB/NJ ou C57Bl/6(J&N) sous diète MCD	↓ 40% poids corporel (~8-10 semaines post-induction)	- ↓ β-oxydation - ↓ assemblage/sécrétion VLDL - ↓ clairance TGs - ↑ TGs hépatique - ↑ sensibilité à l'insuline - ↓ glycémie à jeun	- ↑ stéatose (~3 semaines post-induction) - ↑ fibrose (~5 semaines) - ↑ inflammation - ↑ ballonnement des hépatocytes	M et/ou F	14672613 16285964 15122757
Souris C57BL/6 ou rats Fischer-344 sous diète CDAA	Aucune perte de poids excessive	- ↓ assemblage/sécrétion VLDL - ↓ clairance TGs - ↑ TGs hépatique	- ↑ stéatose - ↑ fibrose (~20-22 semaines)	M et/ou F	8578101 19549522 20347818 27913996
Rats Sprague-Dawley ou Cochons d'Inde Dunkin Hartley sous diète HF-HFD	Aucune prise de poids excessive	- ↑ TGs hépatique - ↑ insuliniémie - ∅ changement de la glycémie	- ↑ stéatose - ↑ fibrose - ↑ inflammation - ↑ ballonnement	M et/ou F	32757283 29953740
Souris C57Bl/6J ou rats Sprague-Dawley sous diète athérogène (cholestérol et acide cholique)	↓ poids corporel (↓ tissus adipeux epididymaires)	- ↑ cholestérol total - ↑ cholestérol non-HDL - ↑ TGs hépatique - ∅ résistance à l'insuline (voire meilleure sensibilité)	- ↑ stéatose (~6 semaines) - ↑ inflammation (~6 semaines) - ↑ ballonnement (~24 semaines) - ↑ fibrose (~24 semaines)	M et/ou F	26064924 23117815
Modèles génétiques					
Souris C57BL/6N surexprimant GP73	↓ poids corporel	- ↓ sécrétion VLDL - ↑ TGs hépatique - résistance à l'insuline - intolérance au glucose	- ↑ stéatose (~6 mois) - ↑ fibrose - ↑ ballonnement	M	34853313
Souris C57Bl/6J GM4951^{-/-} avec ou sous HFD	Aucune prise de poids (∅ changement tissus adipeux)	- ↓ oxydation des lipides - ↑ TGs hépatique - ∅ résistance à l'insuline - ∅ résistance au glucose	- ↑ stéatose - ↑ fibrose	M	35842425
Souris C57BL/6J surexprimant SREBP-1c (spécifique aux adipocytes)	Aucune prise de poids (↓ masse tissus adipeux)	- résistance à l'insuline - ↑ TGs hépatique	- ↑ stéatose - ↑ fibrose - ↑ inflammation - ↑ ballonnement	M et/ou F	9784493 17379003
Souris C57BL/6J PTEN^{-/-} (spécifique au foie)	Aucune prise de poids (↓ masse tissus adipeux)	- ↑ synthèse des AGs - ↑ TGs hépatique - ↑ sensibilité hépatique à l'insuline - ↑ sensibilité glucose	- ↑ stéatose - ↑ fibrose - ↑ inflammation - ↑ ballonnement - développe éventuellement CHC	M et/ou F	14769918 15199412
Souris C57BL/6J AOX^{-/-}	Aucune prise de poids (↓ poids corporel à 5 semaines)	- ↓ β-oxydation peroxisomale - ↑ TGs hépatique	- ↑ stéatose - ↑ fibrose - développe éventuellement CHC	M et/ou F	9624157 8798738
Souris C57BL/6J surexprimant PNPLA3^{T148M}	Aucune prise de poids	- ↑ synthèse des AGs et TGs - ↓ hydrolyse TGs - ↑ TGs hépatique - résistance à l'insuline - hypertriglycéridémie	- ↑ stéatose - ↑ fibrose - ↑ inflammation	M	23023705
Souris surexprimant DGAT1/2	Aucun changement des masses grasse et maigre	- ↑ TGs, DAGs, céramides, AGs insaturés à longue chaîne hépatique - ∅ résistance à l'insuline - ∅ résistance au glucose	- ↑ stéatose	M	17618857

Tableau 1.2. Principales caractéristiques des modèles animaux de NAFLD sans obésité couramment répertoriés dans la littérature (en date du 16 septembre 2022). *Methionine and choline deficient diet (MCD), Choline-deficient L-amino-defined (CDAA), High-Fat-High-Fructose (HF-HFD), Golgi membrane protein (GP73), High-Fat (HFD), sterol regulatory element-binding protein 1c (SREBP-1c), phosphatase and tensin homolog (PTEN), acyl-coenzyme A oxidase (AOX), patatin-like phospholipase domain-containing protein 3 (PNPLA3), Diglyceride acyltransferase 1/2 (DGAT1/2).*

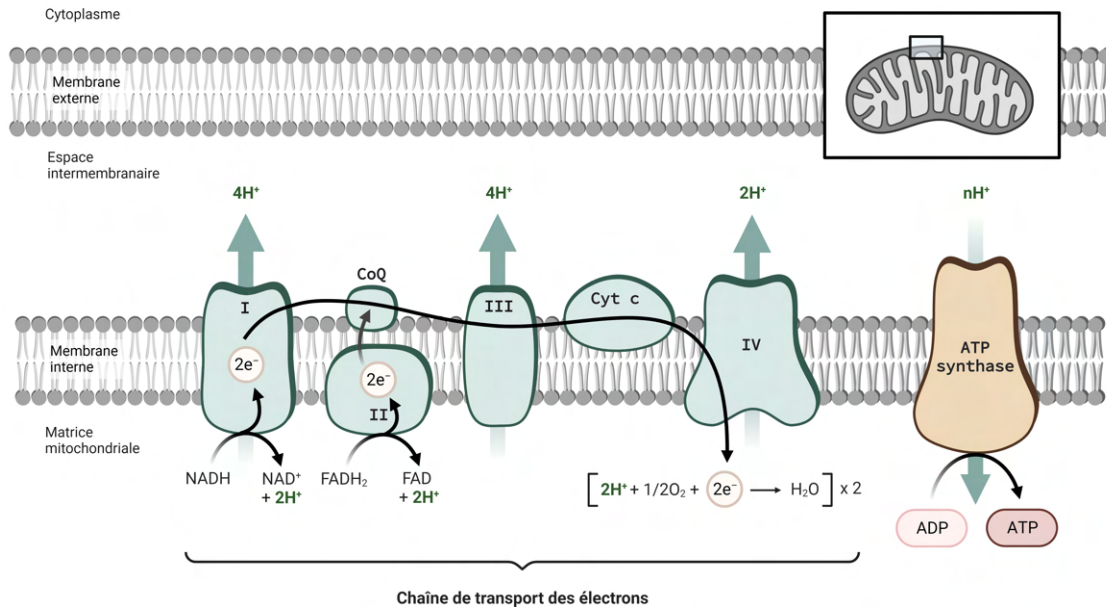


Fig. 2.1. Mécanisme simplifié de la chaîne respiratoire mitochondriale et de la synthèse d'ATP par phosphorylation oxydative. Abréviations: CoQ; coenzyme Q, Cyt c; cytochrome C, $FAD/FADH_2$; Flavine adénine dinucléotide, $NAD^+/NADH$; Nicotinamide adénine dinucléotide. Créée avec BioRender.com.

2.1.2. Dynamique mitochondriale

En fonction des signaux environnementaux et en raison de leur nature hautement dynamique, les mitochondries peuvent subir des adaptations fonctionnelles et structurales afin de répondre aux besoins métaboliques de la cellule par le biais de la biogenèse, à savoir la croissance et la division des mitochondries préexistantes, ainsi que les processus opposés de fission (fragmentation) et fusion (connexion) [125]. L'équilibre entre ces deux processus opposés régule le nombre de mitochondries, leurs tailles et leurs positionnements dans le cytoplasme. Cette dynamique mitochondriale est régulée par des protéines de remodelage membranaire. Au cours de la fusion, MFN1, MFN2 (*mitofusins 1 and 2*) et OPA1 (*optic atrophy-1*) intègrent respectivement les membranes externe et interne mitochondriales [126, 127, 128]. Ce processus est déclenché par les besoins énergétiques et le stress ce qui demande d'accroître la capacité métabolique et la réparation des fragments mitochondriaux endommagés. Quant à la fission, les protéines DRP1 (*dynamamin-like/related protein 1*) et FIS1 (*mitochondrial fission protein 1*) compriment et séparent les tubules mitochondriaux [126, 127, 128]. Ce processus est déclenché dans des conditions de relaxation facilitant la respiration non couplée et étant ainsi liée à la réduction de la synthèse d'ATP. La fission est essentielle à la dégradation mitochondriale où les parties

endommagées des mitochondries sont à leur tour éliminées par l'autophagie mitochondriale, à savoir la mitophagie [129, 130]

2.1.3. Adaptabilité mitochondriale

L'adaptabilité des mitochondries aux besoins cellulaires et aux conditions de stress est obtenue par l'activation de mécanismes intracellulaires avancés [131, 132, 133]. La génération de divers signaux de stress mitochondriaux et de voies de réponse au stress nucléaire entraîne des modifications de l'expression de gènes nucléaires. Le noyau répond à ces signaux en activant des programmes transcriptionnels inducibles par le stress, comme par exemple la protéine kinase activée par l'AMP (AMPK) qui active le coactivateur transcriptionnel PGC-1 α (*peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha*) parmi d'autres. De cette façon, ce contrôle de la qualité mitochondriale renforce la capacité bioénergétique de la cellule en améliorant le réseau mitochondrial par la biogenèse et la fusion et en produisant davantage d'ATP.

Toutes perturbations de la fonction mitochondriale ou tout dysfonctionnement de ce mécanisme de réponse mitochondriale rendent la cellule plus vulnérable aux facteurs de stress endogènes tels que le stress oxydatif ou lipidique. Ceux-ci tendent à provoquer et/ou aggraver les dérèglements métaboliques liés à l'obésité et contribuent probablement à l'évolution de la NAFLD [134]. Ceci étant dit, la littérature concernant les atteintes mitochondriales ne semble que concerner la population souffrant d'obésité avec ou sans comorbidités. Par conséquent, l'implication précise de ces organelles en absence d'obésité est encore très peu comprise et nécessite de plus amples investigations.

2.2. Atteintes mitochondriales dans la NAFLD

L'accumulation anormale de lipides dans le foie est pathognomonique de la NAFLD. En tant que régulateurs majeurs du métabolisme des lipides, il est bien connu que la décompensation des mitochondries induite par la lipotoxicité est étroitement associée à la progression du phénotype obèse de la NAFLD et à ses manifestations extra-hépatiques, y compris les maladies cardiovasculaires (MCVs) [135]. Compte tenu du manque de données concernant l'implication des mitochondries dans le phénotype non obèse, cette section n'abordera que, sauf si mentionné, les recherches ayant été effectuées sur des modèles animaux de NAFLD avec obésité.

Dans la NAFL, une dérégulation du métabolisme lipidique entraîne une accumulation d'AGLs et de TGs hépatiques induisant un changement métabolique pour surmonter la charge hépatique en AGLs. Ce changement comprend une augmentation de la β -oxydation mitochondriale des AGs, l'induction du cycle de Krebs et la stimulation de l'OXPHOS [136]. Régulées par une expression accrue de PPAR- α , facteur de transcription et un régulateur majeur du métabolisme hépatique des lipides, ainsi que par une augmentation de l'AMPK, senseur du statut énergétique cellulaire, ces voies favorisent i) l'acheminement des AGLs vers les mitochondries via CPT-1 alors converti en acyl-CoA par l'acyl-CoA synthétase, ii) l'inhibition de la DNL et iii) l'augmentation de la β -oxydation mitochondriale en empêchant l'inhibition de CPT-1 [137]. Lim et al. ont d'ailleurs montré que l'activation de CPT-1 chez des patients traités souffrant de NAFLD diminuait les marqueurs sériques des lésions hépatiques (e.g. AST, ALT, bilirubine) suggérant qu'une augmentation de l'activité de CPT-1 protégerait contre le développement de la NAFLD [138]. De plus, la régulation à la hausse de UCP2, protéine induisant le découplage de la phosphorylation oxydative de la synthèse d'ATP en dissipant le potentiel de la membrane mitochondriale sous forme de chaleur, protégerait les cellules de l'augmentation des niveaux de ROS chez des rats sous diète MCD présentant alors une perte de poids [139]. Par conséquent, à un stade précoce de la pathologie, l'augmentation de l'activité mitochondriale semble protéger les hépatocytes des effets délétères du dépôt d'AGLs [140].

Cependant, malgré les tentatives du foie à se remettre d'une accumulation excessive de lipides, au long terme, la capacité d'adaptation des mitochondries est insuffisante pour prévenir la lipotoxicité découlant d'un flux continu d'AGLs. Ceci entraîne donc une décompensation aux stades avancés de la maladie caractérisée par une β -oxydation mitochondriale et une OXPHOS accrue, mais insuffisantes [141]. En effet, cela a été démontré dans un modèle de NAFLD induit par une diète déficiente en choline qui présentait à 12 semaines une augmentation de l'efficacité de l'OXPHOS, mais qui perdait cette capacité à 16 semaines [142]. Les mitochondries présentaient alors des altérations des complexes de l'ETC et du potentiel membranaire ainsi qu'une réduction de la synthèse d'ATP entraînant la perte de la capacité des mitochondries à surmonter le flux accru d'AGLs à des stades plus avancés de la maladie. À ces stades, la progression de la maladie a été accélérée par une expression réduite de CPT-1 (~50% chez l'homme [143]), en partie causée par une réduction des intermédiaires délétères générés par une oxydation incomplète des AGs et un changement vers une oxydation accrue du glucose pour la production d'énergie [144], l'altération de la β -oxydation mitochondriale et la déplétion chronique de l'ATP causée par une expression plus élevée d'UCP2 dans les hépatocytes [137].

La sursaturation de ces processus induit inévitablement un dysfonctionnement mitochondrial avec la présence d'une augmentation de la formation de ROS et une activation des voies associées au stress du réticulum endoplasmique (RE). Les hépatocytes étant soumis à un stress oxydatif, cela active NF- κ B et induit la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires notamment TNF- α , IL-1 β , IL-6 et IL-8 [145, 146]. Des modifications cellulaires telles que la présence d'un stress du RE induisant la réponse adaptative UPRmt (*mitochondrial unfolded protein response*), réponse transcriptionnelle permettant de promouvoir la survie cellulaire ainsi que la réparation et la récupération des mitochondries défectueuses ayant par exemple accumulé des protéines non repliées [147], sont également retrouvés et entravent alors l'exportation des lipides et/ou activer la DNL ce qui *in fine* exacerbe la stéatose chez la souris [148, 149]. Au niveau mitochondrial, la NASH se caractérise donc par un état inflammatoire dû à la surproduction de ROS, à la lipotoxicité et à une augmentation de cytokines pro-inflammatoires et pro-fibrinogènes. Sensible aux dommages oxydatifs, le nombre de copies de l'ADNmt se déplete amplifiant de ce fait les lésions hépatiques et compromettant la transcription de protéines mitochondriales critiques telles que PGC-1 α , TFAM et NRF-2 [140, 150]. Par ailleurs, de nombreuses études mettent de l'avant une activité mitochondriale anormale (e.g. capacité respiratoire affaiblie, dynamique mitochondriale altérée) dans le foie, mais également dans le tissu adipeux ou le muscle squelettique et peuvent entre autres contribuer à l'insulino-résistance [135]. Cependant, l'ensemble de ces études ont été répertoriées chez des souris plus ou moins obèses souffrantes de NAFLD et mise sous diète riche en gras laissant que très peu de place à l'étude de la dysfonction mitochondriale dans les modèles expérimentaux et les individus souffrant de NAFLD sans obésité [151]. Chercher à savoir si et comment les mitochondries sont altérées dans la NAFLD sans obésité reste donc à être établis de manière exhaustive [151, 152, 153].

3. Impact du dimorphisme sexuel

La NAFLD est une maladie sexo-dimorphique, avec une prévalence et une gravité généralement plus élevées chez les hommes, tels que décrits chez les patients souffrant d'obésité. Cependant, ce rapport de force change après la ménopause puisque la NAFLD survient à un taux plus élevé chez les femmes. Les principales différences mécanistiques connues entre les sexes, chez une population souffrant d'obésité avant la ménopause, sont représentées dans la figure 3.1.

Brièvement, les femmes et les hommes stockent différemment les calories excédentaires. Tandis que les femmes présentent une adiposité sous-cutanée au niveau glutéo-fémorale (fessiers et cuisses), les hommes présentent une adiposité

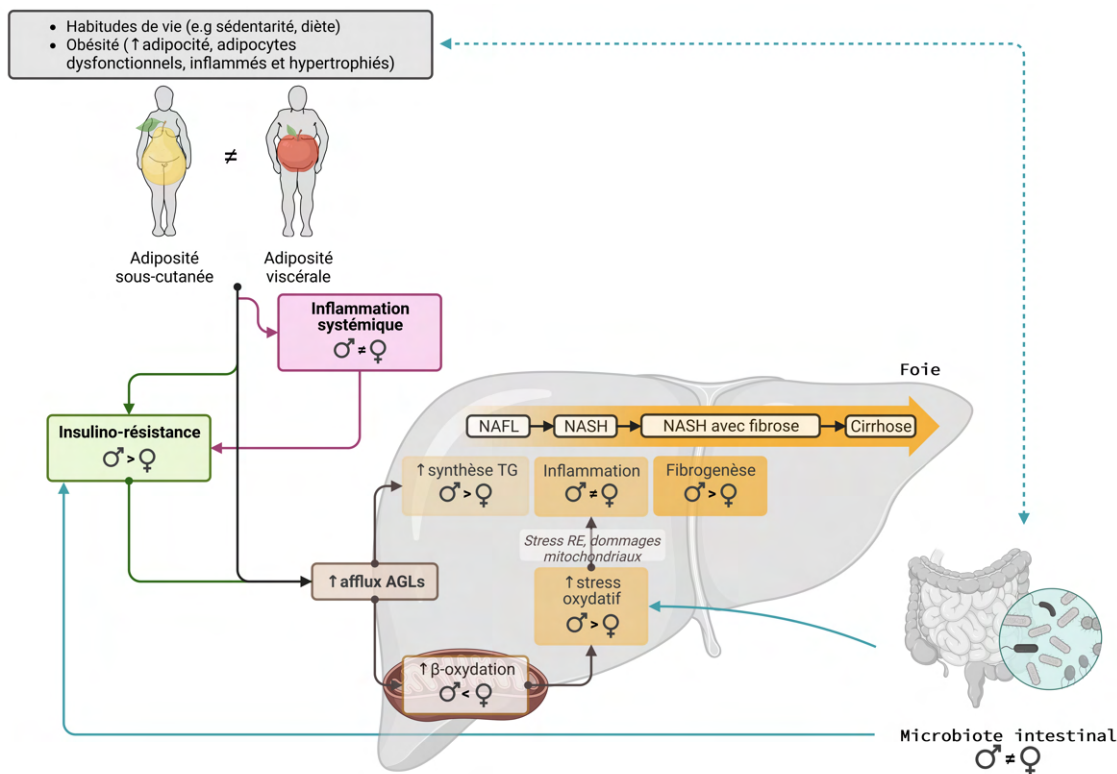


Fig. 3.1. Aperçu de la pathogénèse de la NAFLD et ces différences entre les sexes. L'impact connu des chromosomes et des hormones sexuels n'est pas représenté. Abréviations : AGL; acide gras libre, TG, triglycéride. Créée avec BioRender.com. Adaptée de : Lonardo, A et al. (2019), *Hepatology*. 2016;70:1457-1469.

abdomino-viscérale. Un tissu adipeux hypertrophié et dysfonctionnel, en particulier abdomino-viscéral, entraîne une inflammation systémique et une insulino-résistance [154, 155]. L'ensemble de ces facteurs facilite donc l'afflux d'AGLs vers le foie augmentant, au long terme, le stress métabolique dans les hépatocytes. Comme décrit dans les sections précédentes, l'incapacité des hépatocytes à s'adapter au flux continu d'AGLs entraîne une lipotoxicité et le déclenchement d'un stress oxydatif. Dans ce contexte, une inflammation s'implante et, au long terme, favorise l'installation d'une fibrose, d'une cirrhose puis éventuellement l'apparition de cellules cancéreuses. Le microbiote intestinal et les acides biliaires, tels que brièvement abordés dans les sections précédentes, jouent également un rôle central et sexo-dimorphique dans la NAFLD. En effet, il a été démontré, via des études populationnelles en métagénomique, que le sexe parmi d'autres facteurs (e.g. âge, régime alimentaire, IMC) était corrélé non seulement à la diversité de la composition microbienne, mais également à sa richesse fonctionnelle [156, 157], ces différences ayant un impact significatif sur la dissimilarité entre les sexes dans le métabolisme et les maladies métaboliques

(Fig. 3.1) [158]. Il est d'ailleurs intéressant de brièvement mentionner que l'exposition chronique à l'alcool entraîne une accumulation de TGs dans les hépatocytes et favorise l'inflammation du foie par le biais d'endotoxines provenant de l'intestin [159, 160, 161, 162]; les femmes étant cette fois-ci plus susceptibles que les hommes de développer une ALD malgré une consommation d'alcool plus faible. Les facteurs contributifs seraient entre autres i) une plus faible activité de l'alcool déshydrogénase gastrique [163, 164], ii) une sensibilité accrue des cellules de Kupffer aux lésions dues à l'endotoxine de par la présence des oestrogènes [165, 166] ainsi que iii) une teneur en eau corporelle totale inférieure et une teneur en graisse corporelle supérieure [164, 167]. Dans son ensemble, ce parallèle entre la NAFLD et l'ALD démontre encore une fois l'importance de cibler les différences sexuelles multisystémiques dans l'étude des maladies hépatiques.

Les modèles animaux de la NAFLD récapitulent généralement les différences entre les sexes observées chez les patients avec une NAFL ou une NASH. En effet, la littérature recense plus de cytokines proinflammatoires et profibrotiques, des grades plus avancés de NASH, un environnement plus propice à la fibrose et une incidence plus élevée de tumeurs hépatiques chez les sujets masculins que féminins [168, 169, 170]. De plus, un modèle computationnel récent, dont les données informatiques ont été prises chez la souris, a conclu que les foies féminins et masculins sont des organes métaboliquement distincts, avec des régulateurs uniques modulant les résultats métaboliques sexe-spécifiques [152]. Via, la présence de récepteurs β -oestrogènes, les oestrogènes régulent en partie i) le remodelage de la matrice hépatique via les cellules stellaires [171, 172] et ii) les réponses immunitaires via les cellules immunitaires (revue dans: [173]) et la production de cytokines inflammatoires [174]. De ce fait, il est suggéré que les cellules immunitaires innées des souris mâles sont activées de manière à favoriser l'inflammation et la fibrose hépatique, tandis que les macrophages des souris femelles présentent un phénotype régulateur ou plus protecteur et anti-fibrotique (revue dans : [170]). En partie expliqués par une production plus élevée de cytokines pro-inflammatoires et par les effets inhibiteurs des oestrogènes, les animaux mâles développent de ce fait plus souvent des tumeurs hépatiques que les femelles [175]. Chez l'humain, il est intéressant de noter que des études ont suggéré que chez les hommes en bonne santé, le risque de NAFLD est inversement corrélé aux taux sanguins d'oestradiol [176, 177]. D'ailleurs, aux états-Unis, deux études ont démontré que la prévalence de la NASH chez les femmes ménopausées (âge moyen de 51 ans) était équivalente à celle des hommes [178], et que la ménopause prématurée augmentait le risque de fibrose et de NASH [179]. De ce fait, les hormones sexuelles (notamment les œstrogènes) ont un rôle fondamental dans la protection du

foie. Il est cependant important de noter que les oestrogènes ne sont pas les seules responsables du dimorphisme sexuel de la NAFLD.

L'implication des chromosomes XX et XY, bien que très peu répertoriée dans la littérature [180], ainsi que celle des androgènes est également à prendre en considération. Par exemple, chez des femmes présentant le syndrome des ovaires polykystiques avec hyperandrogénie, celles-ci présentaient un risque significativement plus élevé de NAFLD que les patients témoins avec des taux normaux de testostérone et de manière intéressante, ce profil était également lié à une insulino-résistance [181, 182]. Par ailleurs, une analyse à grande échelle des profils transcriptomiques de foies humains a en effet souligné la nature sexuellement dimorphique de la NASH et de la fibrose via l'identification de signatures génétiques spécifiques aux sexes (e.g. profil plus porté sur les processus associés au cycle cellulaire chez les femelles et sur les processus métaboliques et inflammatoires chez les hommes), ces dernières ayant une capacité prédictive assez élevée dans des cohortes indépendantes [183].

Cependant, malgré les progrès considérables de la recherche sur la NAFLD, notre compréhension des différences entre les sexes dans la NAFLD reste insuffisante et cela est encore plus le cas dans la NAFLD sans obésité. D'ailleurs, de manière surprenante, chez les sujets ne présentant pas d'obésité ($IMC < 25 \text{ kg/m}^2$), la NAFLD a été associée à un âge plus jeune [184, 185] et dépendamment des études, soit au sexe féminin [185], soit au masculin [184]. Compte tenu du fait que la littérature semble diverger sur ce dernier point, évaluer l'impact du sexe dans la NAFLD sans obésité semble d'autant plus important.

À la lumière des évidences révélées dans cette revue de littérature, il apparaît donc primordial de se pencher sur les bases fondamentales du développement et de la progression de la NAFLD sans obésité, d'autant plus qu'avec les risques associés et notamment cardiovasculaires, la médecine au Canada s'oriente vers une pratique de plus en plus personnalisée [186].

4. Preuve de concept avec le modèle murin H-Lrrprc^{KO}

Dans ce premier chapitre il a été mis en évidence que l'adaptabilité mitochondriale est un point tournant dans le développement et la progression NAFLD, la NASH pouvant même être considérée comme une maladie mitochondriale [134, 187]. Lors de la progression de la maladie et en concomitance avec certains facteurs de risque, des manifestations extra-hépatiques et notamment cardiovasculaires peuvent apparaître. En

effet, un grand nombre de publications indiquent que les personnes souffrant de NAFLD avec obésité peuvent présenter des anomalies cardiaques telles qu'une dysfonction diastolique ou une hypertrophie cardiaque (Figure 4.1). Cependant, les conséquences cardiovasculaires et les mécanismes sous-jacents dans la population sans obésité, mais souffrants de NAFLD ne sont pas très bien répertoriés (Tableau 1.1).

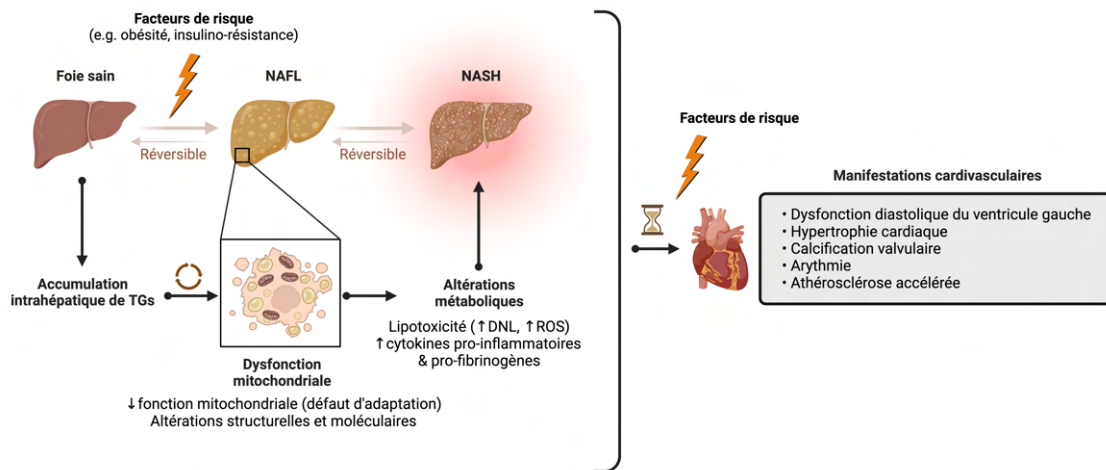


Fig. 4.1. Implication de la dysfonction mitochondriale dans la progression de la NAFLD dans la population souffrant d'obésité. Abréviations: DNL; lipogenèse de novo, TG; triglycéride, ROS; espèces réactives à l'oxygène. Créée avec BioRender.com.

De ce fait, puisque **i)** nous manquons de connaissances concernant les répercussions cardiaques d'une NAFLD sans obésité, impact non négligeable sur la santé des patients, et **ii)** que l'implication spécifique des mitochondries hépatiques n'est pas explicitement répertoriée, il apparaît d'autant plus important de caractériser l'impact cardiaque d'une NAFLD sans obésité des suites d'une atteinte mitochondriale. Dans le but d'évaluer cela indépendamment de toute perturbation métabolique préexistante et des comorbidités en soi, nous avons tiré parti d'un modèle murin hépatodéficient pour le gène *Lrp1rc* (H-*Lrp1rc*^{KO}; KO) présent au laboratoire. Retrouvé dans le génome nucléaire, ce gène encode pour la protéine LRPPRC (*leucine-rich pentatricopeptide repeat motif containing*) avec une séquence d'adressage mitochondriale. LRPPRC permet la stabilisation des ARNm mitochondriaux [188, 189, 190]. Sa déficience cause notamment une altération de l'ultrastructure mitochondriale et un défaut d'assemblage des complexes de la chaîne respiratoire, en particulier le complexe IV et l'ATP synthase [188, 191, 192]. Cette déficience entraîne alors une dysfonction mitochondriale.

4.1. Phénotype

D'un point de vue phénotypique, la souris H-*Lrp1rc*^{KO} a précédemment été caractérisée par son hépatopathie mitochondriale en absence d'obésité, récapitulant dans une certaine mesure les changements décrits dans la NAFLD [191, 193]. En effet, ce modèle murin possède une signature lipidomique et circulante caractéristique de la NAFLD avec notamment une augmentation des niveaux hépatiques de TGs et une augmentation des niveaux plasmatiques des acylcarnitines à longue chaîne (LCACs), marqueur d'une perturbation de l'oxydation des acides gras mitochondriaux [193]. Ce modèle apparaît donc pertinent pour trois raisons : i) comme précédemment évoqué, la dysfonction mitochondriale est au centre du développement et de la progression de la NAFLD, ii) de par son hépato-spécificité, ce modèle nous permet d'isoler les manifestations cardiaques de tout autres effets systémiques confondants et iii) ne prends pas de poids malgré des signes évidents d'une pathologie hépatique.

5. Objectifs, hypothèses et méthodes expérimentales

Dans le cadre de ce projet de maîtrise, l'étude avait pour objectif de caractériser chez la souris H-*Lrp1rc*^{KO}, les changements métaboliques qui sous-tendent les manifestations cardiaques de la NAFLD sans obésité, tout en évaluant la présence éventuelle d'un dimorphisme sexuel. Les sous-objectifs de cette étude sont de **i)** valider le phénotype hépatique chez la souris H-*Lrp1rc*^{KO}, **ii)** caractériser les manifestations cardio-métaboliques, **iii)** évaluer l'impact fonctionnel cardiaque et **iv)** évaluer la présence d'un dimorphisme sexuel. Nous nous attendions à ce que les manifestations cardiaques impliquent de profonds changements métaboliques sexe-dépendants.

Notre hypothèse se base sur la caractérisation faite à 5 semaines par Cuillerier et al. en 2017 [191] puis par la révélation d'un remodelage du lipidome circulant à 14 semaines, publiées en 2019 par Ruiz et al. [193]. En effet, nous supposons qu'à 14 semaines, le phénotype hépatique se soit détérioré en s'approchant peut-être davantage de la NASH que de la NAFL observée à 5 semaines d'âge. De plus, avec la présence d'un remodelage du lipidome circulant, nous pouvons spéculer que cela ait un impact sur le métabolisme du glucose ainsi que le métabolisme et la fonction cardiaque. Par ailleurs, nous nous attendons à ce que les manifestations cardiaques impliquent de profonds changements métaboliques sexe-dépendants.

Notre but a été d'essayer de relier les phénotypes hépatique et cardiaque à des changements du métabolisme du glucose et des lipoprotéines. Pour ce faire, nous avons eu recours à diverses techniques. Le phénotype hépatique a tout d'abord été évalué par la combinaison d'approches histologique et moléculaire ainsi qu'en séquençant à haut débit le transcriptome hépatique (RNA-seq). Le profil circulant a ensuite été

survolé en ciblant i) le métabolisme du glucose, principalement par la mesure de la glycémie et de l'insulinémie et ii) le métabolisme des lipides via l'analyse du profil des lipoprotéines plasmatiques. Finalement, le phénotype cardiaque a été étudié en ayant pour objectif de regarder le métabolisme mitochondrial par approches moléculaires et fonctionnelles (respiration mitochondriale), d'analyser le lipidome cardiaque par son criblage au LC-MS/MS et d'évaluer la fonction cardiaque grâce à un cathéter de type Millar.

Synthèse

L'article présenté ci-après reprend le rationnel, la mise en oeuvre des protocoles et l'analyse des résultats obtenus depuis ces deux dernières années.

Ce projet de maîtrise a vu le jour suite à la découverte quelque peu accidentelle d'un dimorphisme sexuel dans la signature lipidomique circulante ainsi que la présence d'une diminution cardiaque des niveaux de cardiolipines, marqueur d'une atteinte mitochondriale, chez les souris H-*Lrpprc*^{KO}. Est alors venue l'idée d'examiner l'axe foie-coeur, avec pour objectif de mieux comprendre l'impact du phénotype hépatique sur les mécanismes qui sous-tendent la présence de ces manifestations circulantes et cardiaques. Ne présentant pas d'obésité, notre laboratoire a alors utilisé ce modèle murin comme preuve de concept dans la compréhension de cette dynamique multisystémique présente également chez les humains souffrant de NAFLD sans obésité, mais malheureusement encore trop peu étudié. L'article présente ainsi les résultats obtenus dans l'analyse de cet axe foie-circulation-coeur.

Compte tenu du fait que cet article aborde l'ensemble des manipulations et résultats générés au cours de ces dernières années, la section matériels et méthodes n'a pas fait l'objet d'un chapitre, mais figure dans l'article ci-après.

L'étudiante a contribué à l'élaboration et la mise en oeuvre du protocole. Les manipulations et expérimentations animales ont été entièrement réalisées par celle-ci. SD et HB ont gentiment prêté main-forte à la réalisation de certaines expériences moléculaires. Les données brutes de transcriptomique ont été générées par la plateforme de bio-informatique d'Ottawa. AC a réalisé les expériences de respiration mitochondriale sous la supervision de YB, CD a généré les données de lipidomique sur la plateforme de métabolomique de l'Institut de Cardiologie de Montréal (ICM). Les précieuses collaborations avec MGS, BC et MEC de la plateforme d'histologie de l'ICM ainsi que CM et NT nous ont permis d'avoir respectivement accès aux données d'histologie et des profils lipoprotéiques. L'ensemble des résultats ont été analysés par l'étudiante avec l'aide de SD et MR. Le manuscrit a été écrit en collaboration avec MR et la révision a été réalisé par SD, CM, MGS, YB et MR. Les abréviations des auteurs sont définies dans l'article.

First article.

A Novel Genetic Mouse Model of Lean-NAFLD Unveils Sexual Dimorphism in the Liver-Heart Axis

by

Charlotte Burelle^{1,2}, Sonia Deschênes², Alexanne Cuillerier³, Marine De Loof², Marie-Eve Higgins², Hugues Boel², Caroline Daneault², Billie Chouinard², Marie-Elaine Clavet², Nolwenn Tessier^{1,2}, Isabelle Croteau², Catherine Martel^{1,2}, Martin G. Sirois^{2,4}, Yan Burelle³, Matthieu Ruiz^{2,5}

(¹) Department of Medecine, Université de Montréal, Montréal, QC

(²) Research Center, Montreal Heart Institute, Montréal, QC

(³) Faculty of Health Sciences and Medicine, University of Ottawa, Ottawa, ON

(⁴) Department of Physiology and Pharmacology, Université de Montréal, Montréal, QC

(⁵) Department of Nutrition, Université de Montréal, Montréal, QC

This article was submitted in Communication Biology.

Autorisations

Tous les travaux publiés ultérieurement ont obtenu l'autorisation des coauteurs pour être publiés dans ce mémoire. Les licences sont indiquées ci-dessous, ainsi que les contributions de l'étudiante :

1- A Novel Genetic Mouse Model of Lean-NAFLD Unveils Sexual Dimorphism in the Liver-Heart Axis

Charlotte Burelle, Sonia Deschênes, Alexanne Cuillerier, Marine De Loof, Marie-Eve Higgins, Hugues Boel, Caroline Daneault, Billie Chouinard, Marie-Elaine Clavet, Nolwenn Tessier, Isabelle Croteau, Catherine Martel, Martin G. Sirois, Yan Burelle, and Matthieu Ruiz

Contribution: 65% de la conception de l'étude; réalisation des expériences, analyses des données, écriture du manuscrit

Licence: Manuscrit soumis mais pas encore accepté au moment de la soumission de ce mémoire.

Résumé. Les patients non obèses atteints de stéatose hépatique non alcoolique (NAFLD) peuvent développer des complications cardiaques indépendamment des perturbations métaboliques préexistantes et des comorbidités. Pour étudier les mécanismes sous-jacents indépendants du développement de l'obésité, nous avons utilisé un modèle murin ayant une atteinte mitochondriale hépatique. L'axe foie-coeur a donc été étudié puisque ces souris développent une stéatose microvésiculaire sans obésité. Nos résultats ont dévoilé un remodelage phénotypique dépendant du sexe, allant au-delà des lésions hépatiques. Les mâles, un peu plus que les femelles, présentaient une hypoglycémie à jeun et une sensibilité accrue à l'insuline. Ils présentaient une légère dysfonction diastolique, un remodelage des lipoprotéines circulantes ainsi que du lipidome cardiaque. À l'inverse, les femelles ne manifestaient pas de dysfonctionnement cardiaque, mais présentaient des déficiences cardiométaboliques soutenues par une altération de l'intégrité mitochondriale et de la β -oxydation, un remodelage des lipoprotéines circulantes et une accumulation intracardiaque de triglycérides délétères. Cette étude souligne que les défauts métaboliques du foie peuvent entraîner des anomalies significatives dépendantes du sexe et indépendamment de l'obésité. Ce modèle expérimental peut s'avérer utile pour mieux comprendre la variabilité liée au sexe impliquée dans la progression de la NAFLD sans obésité.

Mots clés : dimorphisme sexuel, maladies hépatiques, stéatose hépatique non-alcoolique sans obésité, maladies cardiovasculaires, physiopathologie cardiaque, maladies métaboliques, métabolisme, dysfonction mitochondriale

Abstract. Lean patients with non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) may develop cardiac complications independently of pre-existent metabolic disruptions and comorbidities. To address the underlying mechanisms independent of the development of obesity, we used a murine model of hepatic mitochondrial deficiency. The liver-heart axis was studied as these mice develop microvesicular steatosis without obesity. Our results unveiled a sex-dependent phenotypic remodeling beyond liver damage. Males, slightly more than females, showed fasting hypoglycemia and increased insulin sensitivity. They exhibited mild diastolic dysfunction, remodeling of the circulating lipoproteins and cardiac lipidome. Conversely, females did not manifest cardiac dysfunction, but exhibited cardiometabolic impairments supported by impaired mitochondrial integrity and β -oxidation, remodeling of circulating lipoproteins and intracardiac accumulation of deleterious triglycerides. This study underscores that metabolic defects in the liver can result in significant sex-dependent abnormalities independent of obesity. This experimental model may prove useful to better understand the sex-related variability involved in the progression of NAFLD in a lean population.

Keywords: sexual dimorphism, liver diseases, lean patients with non-alcoholic fatty liver disease, heart diseases, heart pathophysiology, metabolic diseases, metabolism, mitochondrial dysfunction

6. Introduction

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) affects approximately 25% of the world population and is associated with metabolic comorbidities including obesity, type 2 diabetes, hyperlipidemia, and hypertension [1]. Currently, the most frequent cause of death in NAFLD is cardiovascular diseases (CVDs). Although regularly associated with overweight and obesity, NAFLD is increasingly being identified in lean individuals. In fact, a 2020 meta-analysis estimated that among the NAFLD population, the overall prevalence of non-obese NAFLD is just over 40%, with 1 in 5 patients being lean (BMI < 25kg/m²; [2]). Furthermore, it has been repeatedly suggested that NAFLD in lean and obese people represent distinct pathophysiological entities (reviewed in [3]).

Data on the long-term cardiovascular outcome of NAFLD in the lean population are limited. Yet, they show that lean individuals with NAFLD have a lower prevalence of metabolic comorbidities (e.g., diabetes, hypertension, hypertriglyceridemia, obesity, metabolic syndrome), but higher liver fibrosis scores and elevated cardiovascular morbidity and all-cause mortality in advanced stages compared to obese individuals with NAFLD (reviewed in [4]). Considering the greater cardiovascular risk associated with NAFLD in lean people, it is crucial to better understand the mechanisms leading to the development of cardiac abnormalities in this population.

In the obese population, NAFLD is accompanied by a constellation of systemic alterations and comorbidities which collectively contribute to the development of cardiovascular complications (reviewed in [5]). This includes, but is not limited to, adipose tissue dysfunction [6], ectopic deposition of fatty acids in peripheral tissues (e.g., skeletal muscles, heart; [7]), insulin resistance as well as hyperglycemia and its adverse cellular consequences (e.g., formation of reactive oxygen species and pro-inflammatory processes; [8]). Nevertheless, a significant proportion of lean patients with NAFLD do not present most of these systemic alterations and comorbidities, which suggests that the liver pathology *per se* plays a predominant role in the pathogenesis of cardiac complications. However, it is challenging to experimentally dissociate liver pathology from systemic disturbances and comorbidities.

Abnormal lipid accumulation in the liver is pathognomonic for NAFLD. As major regulators of lipid metabolism, it is well known that mitochondria dysfunction induced by lipotoxicity is closely associated with the progression of the obese NAFLD phenotype, and its extra-hepatic manifestations including CVDs (reviewed in [9]). To study the cardiac abnormalities of lean NAFLD independent of any pre-existent metabolic disruptions and comorbidities *per se*, we took advantage of our hepatic Lrp1rc knock-out (KO) mouse model who presents a mitochondrial dysfunction associated with a defect in the assembly of respiratory chain complex IV [10, 11, 12].

This model has been previously characterized by its mitochondrial hepatopathy in the absence of obesity, recapitulating to some extent the circulating lipidomic signature described in NAFLD (e.g., higher levels of hepatic triglycerides (TGs) and long-chain acylcarnitines (LCACs), as well as changes in plasma glycerophospholipids [11, 13]. The aim of the present study was therefore to characterize the cardiac abnormalities of lean NAFLD. Considering the notable impact of sex in the initiation and progression of this disease [14], we also assessed the sex impact. Our results reveal that loss of hepatic LRPPRC triggers a multi-faceted phenotypic remodeling that goes beyond liver damage, with notable disturbances in glucose metabolism metabolic and functional cardiac impairments that are sex-dependent, highlighting that metabolic and contractile abnormalities are not necessarily coupled in this model. This study gives new insight into the crucial involvement of mitochondria in the pathophysiological of lean NAFLD and its impact on CVDs.

7. Materials and Methods

7.1. Animal model

The study protocol was approved by the animal research and ethics committee of the Montreal Heart Institute. All experiments were conducted in accordance with the Canadian guidelines to the care and use of experimental animals. Liver-specific *Lrp-prc*-null mice (H-*Lrp-prc*^{KO}, KO) were produced and selected as previously described [11]. Mice were maintained in a specific pathogen-free facility on a regular 12-12h light-dark cycle. All mice had access to standard chow diet and water ad libitum. Animals (20 WT, 20 KO; 50:50 male:female) were weighed, and monitored for their caloric intake once a week. At 14 weeks of age, mice used for experiments were euthanized under isoflurane by exsanguination through the thoracic aorta preceding heart removal. Blood was collected from non-fasted mice in EDTA-coated syringes. Plasma was recovered following centrifugation (2000g, 15min, 4°C), and stored at -80°C pending further experimentations. The heart, liver, perigonadal white adipose tissue (WAT), interscapular brown adipose tissue (BAT), gastrocnemius, soleus, and tibia were collected, rinsed in cold 0.9% saline, weighted, flash frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C.

7.2. Histology

Hematoxylin-Phloxine-Saffron. For a general assessment of histopathology, livers were rapidly excised and fixed in 10% formalin PBS-buffered solution for 5 days. Tissues

were dehydrated by incubating in a series of solutions with an increased ethanol content (70, 95 and 100%), followed by xylene, and embedded in paraffin [15]. Samples were cut into 6- μm sections, and processed with Hematoxylin-Phloxine-Saffron (HPS) staining. HPS slides were examined by bright-field microscopy (BX45, Olympus, Richmond Hill, ON, Canada), and images were acquired under 10x magnification. For each slide, 3 different lobules were taken centering on the central vein. The aim was to identify, by qualitative analysis, the possible presence of histopathological signs. The most representative image of each group was chosen for publication.

Oil Red'O. To quantify steatosis, serial cryosections of 10- μm thickness were taken from livers. On frozen sections, slides were fixed in 10% formalin, incubated in propylene glycol, and processed with Oil Red O 0.7% (ORO) staining for 2 days. After washing with a series of solutions with a decreased propylene glycol content (100%, and 85%), sections were briefly processed in Mayer's hematoxylin solution (Leica Biosystems Inc., Buffalo Grove, IL). Following washing, slides were mounted in a glycerin jelly medium. ORO slides were examined by bright-field microscopy (BX45, Olympus, Richmond Hill, ON, Canada), and images were acquired under 20x magnification. For each slide, 3 different lobules were taken centering on the central vein. Lipid droplet number and morphology in individual hepatocytes were quantified using ImageJ (NIH). The most representative image of each group was chosen for publication. Masson's trichrome staining. To quantify heart fibrosis, hearts were paraffin-embedded and transverse sections (6- μm) of the ventricles were prepared and stained with Masson's trichrome solution [16]. A blind analysis of one section per heart was performed by bright-field microscopy (BX45, Olympus, Richmond Hill, ON, Canada), and full heart images were acquired under 10x magnification. Collagen content was quantified by color segmentation using ImageJ (NIH), and expressed as a percentage of the surface area.

7.3. Glucose metabolism

Glycemia and insulinemia monitoring. Blood glucose was monitored using a glucometer at 5, 7, 9, 11, and 13 weeks of age at 2pm following a 5h food withdrawal. Blood samples (100 μl) were collected at 9, and 14 weeks of age to quantify insulinemia based on the manufacturer's protocol (Rat/Mouse Insulin ELISA Kit; cat. EZRMI-13K; Millipore Sigma).

Insulin Tolerance Test (ITT). ITT was performed at 11 weeks of age. Biosynthetic human insulin (Humulin R U-100; Eli-Lilly, Indianapolis, IN; 0.6U/kg body weight) was injected intraperitoneally in conscious mice at 2pm after 5h food withdrawal. Blood glucose was measured using a glucometer at 0, 15, 30, 45, 60, 90, and 120 minutes after insulin

administration. Area under the curve (AUC) was calculated.

Oral Glucose Tolerance test (OGTT). OGTT was performed at 12 weeks of age. Glucose (dextrose solution, 2g/kg body weight; Hospira Inc., Lake Forest, IL) was administered orally by gavage in conscious mice at 9:30am after a 16h fast. Blood glucose was measured using a glucometer at 0, 15, 30, 45, 60, 90, and 120 minutes after glucose administration. Blood samples were taken from the lateral saphenous vein prior to the gavage (0 minutes), and at 30 minutes. Subsequent samples were processed to quantify insulinemia based on the manufacturer's protocol (Rat/Mouse Insulin ELISA Kit; cat. EZRMI-13K; Millipore Sigma). Area under the curve (AUC) was calculated.

7.4. Total cholesterol in plasma lipoprotein profile

Plasma of fed 14-weeks old mice were used to measure total cholesterol in plasma lipoprotein fractions. Lipoproteins were separated from plasma by size exclusion chromatography fast protein LC (FPLC) using a Superose 6 column on a FPLC system with a Model 500 pump from Waters (Milford, MA). In short, and as described [17], a 100- μ l aliquot of mouse plasma pooled equally from four different mice per group was injected into a 1.0-ml sample loop and separated with a buffer (0.15M NaCl, 0.01M Na₂HPO₄, and 0.1mM EDTA) at a flow rate of 0.5 mL/min. Sixty fractions of 300- μ l each were collected with the lipoproteins being contained within. Batch analysis was performed to measure circulating total cholesterol (Fujifilm Medical Systems U.S.A., Inc. cat. 999-02601) in plasma lipoprotein fractions according to the manufacturer's protocol.

7.5. Cardiac function assessment using Millar catheterization

Fed mice were anesthetized with 2% isoflurane in 100% O₂ at a flow rate of 2L/min at 14 weeks of age. Body temperature was monitored and maintained at 37°C using a heating pad. Cardiac hemodynamics parameters were measured using a microtip pressure transducer catheter (1,4-F; Millar Instruments) inserted into the left ventricle through the carotid artery as previously described [18]. Data were collected and analyzed using IOX software (v.2.10.8.25; emka TECHNOLOGIES, Falls Church, VA). Blood pressure, intraventricular pressures (systole, diastole), and heart rate (HR) measurements were taken when a steady state was reached and represented an average value. Subsequent mice were euthanized, and organs were harvested as described in the animal model section.

7.6. Cardiac untargeted lipidomic using LC-QTOF

Untargeted lipidomic analyses using LC-QTOF were performed using a previously validated workflow [13, 19]. Briefly, lipids were extracted from powdered heart tissues (50mg/sample) and spiked with six internal standards (LPC 13:0, PC14:0/14:0, PC19:0/19:0, PS12:0/12:0, PE17:0/17:0, PG15:0/15:0; Avanti Polar Lipids Inc, Alabaster, USA). Following lipids extraction, samples (0.7 μ l for positive mode, and 2 μ l for negative mode) were injected into a 1290 Infinity HPLC coupled to a 6530 accurate mass QTOF MS system equipped with a dual electrospray ionization (ESI) source. Elution of lipids was assessed on a Zorbax Eclipse plus column (C18, 2.1x100mm, 1.8 μ m, Agilent Technologies Inc.) maintained at 40°C using a 83min chromatographic gradient of solvent A (0.2% formic acid and 10mM ammonium formate in water), and B (0.2% formic acid and 5mM ammonium formate in methanol/acetonitrile/methyl tert-butyl ether [MTBE], 55:35:10 [v/v/v]). Samples were analyzed in positive scan mode. MS data were processed using the Mass Hunter Qualitative Analysis software package (version B.06.00, Agilent Technologies Inc.), and a bioinformatics pipeline that we have developed as previously described [19]. Lipid final annotation was achieved using MS/MS analysis on all discriminant MS features. Based on their structures, lipids were annotated by i) searching the mass-to-charge ratio of selected features in METLIN database and ii) identifying the polar head and acyl chains based on their signature fragment ion on the MS/MS spectra. Covariance analyses were performed to test the impact of sex.

7.7. RNA-sequencing analyses

RNA-sequencing data were generated at StemCore Laboratories (Ottawa Hospital Research Institute, ON) from livers of fed mice.

Library quantification and construction – Quantification of input Total RNA samples (300-1000ng of total RNA) were performed with the Qubit HS RNA assay (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA), and the fragment size was evaluated with the Fragment Analyzer HS NGS assay (Agilent, Santa Clara, CA). An RNA Quality Number (RQN) of 8.0 or higher was considered satisfactory quality for library construction. A total of 40 Total RNA samples were submitted for RNA-seq, and library construction was performed with the Truseq stranded mRNA (Illumina, San Diego, CA). Libraries were prepared with unique barcodes compatible with the Illumina NextSeq 500 platform and were quantified with the Qubit HS RNA assay. Library fragment size were evaluated preceding normalization to the same concentration. Samples were subsequently pooled in equal amounts.

Next Generation Sequencing – The library pools were diluted as required to achieve maximal cluster density and run on 5 x High Output Flow Cells on the NextSeq 500. PhiX was spiked in as a control. The samples underwent 1 x 75 cycles of single-end sequencing. This approach yielded up to 50 million reads per sample prior to filtering.

Analyses – From the list of non-filtered transcripts reported, those that were below the detection threshold for all conditions were excluded. Transcripts that were below the detection threshold in at least 50% of the mice in the control condition were also excluded. Multiple unpaired t-tests following by a false discovery rate (FDR) multiple comparison post hoc analysis (Two-stage step-up (Benjamini, Krieger, and Yekutieli)) were performed for each comparison. Transcripts were considered a discovery when $q\text{-value} < .05$ (desired FDR (Q) $< 5\%$). Transcripts were classified as up- or down-regulated based on their \log_2 fold-change (FC). For each comparison, the Cytoscape (version 3.9.1) ClueGO v2.5.9 plugin [20] was used to cluster transcripts significantly enriched. A functionally group network was therefore generated following enrichment analyses of GO terms (Molecular Function, Cellular Component, and Biological Process) and pathways (KEGG database). The generated clusters reflect the relationships between the terms based on the similarity of their associated genes. To have detailed pathways, the GO tree interval was set at 7-15 with a minimum of 2 transcripts from the uploaded list that were i) associated to a GO term, and ii) represented at least 20% from the total number of transcripts of the GO term. The degree of connectivity between terms was automatically calculated using the kappa score set at 0.5 in this study. The size of the nodes reflected the statistical significance of the terms, and the ClueGO plugin automatically generated cluster labels based on the most significant term of a group. Therefore, the node color showed the proportion of transcripts from each cluster that are associated to the term. A classical Fisher's exact test following by a Bonferroni step-down multiple comparison post hoc analysis was by default performed to show the significance of the terms and groups. To ensure that the results were more readable, only pathways with a $pV \leq .05$ were shown.

7.8. Respirometry on isolated cardiac mitochondria

As previously described [11], cardiac mitochondria were isolated and respiration was measured using Clark-type electrodes at 23°C under continuous stirring. Mitochondria (0.5 mg prot/mL) were suspended in respiration buffer (in mM: 10 KCl, 5 K₂HPO₄, 10 MOPS, 9 Pi, 2.5 MgCl₂, 1 mg/mL BSA; pH 7.4). Following baseline recording, oxidation of long-chain fatty acids was measured following separate supplementation with i) palmitoyl-carnitine (20 μ M) and ii) palmitoyl-CoA (5 μ M) and L-carnitine (5 mM). Both supplementation were in the presence of malate (2.5 mM) and ADP (1 mM).

7.9. Molecular analyses

Quantitative RT-PCR - Gene transcript levels from frozen liver and heart tissues were assessed as previously described for hearts [13, 18] using an RNeasy kit (QIAGEN), and reverse transcribed with the High-Capacity cDNA RT kit (Thermo Fisher Scientific) as recommended by the manufacturer. Quantification was achieved by MxPro software (Agilent Technologies Inc.) and reported using the $\Delta\Delta CT$ method. Gene transcript levels were normalized to Ywhaz and Tbp in hearts and livers, respectively. The list of primers used is reported in Supplementary Table 9.1. *Immunoblotting*. Protein levels from frozen liver tissues were assessed following loading and running of 20 μg of protein per sample on 12.5% polyacrylamide gels. Samples were transferred to nitrocellulose membrane and used for the detection of LRPPRC (1:1000; LRP130 Rabbit Ab, cat. PA5-22034, Thermo Scientific), MTCO1 (1:10 000; Anti-MTCO1 antibody [1D6E1A8], cat. ab14705, Abcam), Glycogen Synthase (1:1000; Glycogen Synthase (15B1) Rabbit mAb, cat.3886S, Cell Signaling), and PEPCK (1:1000; PEPCK (H-300) Rabbit polyclonal IgG, cat. sc-32879, Santa Cruz Biotechnology). β -actin (1:50 000; β -actin HRP (C4), cat. sc-47778, Santa Cruz Biotechnologies) was used for normalization. ELISA and enzyme activity assays. Levels of plasma cortisol (Cortisol (human/mouse/rat) ELISA Kit; cat. K7430-100; Biovision), ALT (ALT Activity Assay, cat. MAK052, MilliporeSigma), and AST (AST Activity Assay Kit, cat. MAK055, MilliporeSigma) were measured spectrophotometrically in a plate reader using ELISA, and standard coupled enzyme assays according to the manufacturer for cortisol, and adapted for ALT (1:5), and AST (1:10) [21].

7.10. Statistical analyses

Unless indicated, data are presented as mean \pm SEM. Two-way analysis of variance (ANOVA) following by Šidák multiple comparison post hoc analysis was used to test for differences in the effects of the genotype and sex variables on the dependant variable. Moreover, it was assumed that the data (n=10/group) were approximately following a normal distribution. Therefore and to compare KO males to KO females, paired t-tests were performed. Statistically significant differences were considered for a p-value $< .05$. All analyses were performed using Prism 9.4.0 for Mac OS-X.

8. Results

8.1. Loss of hepatic LRPPRC does not lead to obesity

Lrpprc knockout (KO) model was validated by the 60% hepatic decrease in LRPPRC protein content similarly in both KO males and females mice (Fig.8.1A). As expected, this hepatic loss induced a significant and sex-independent decrease of the respiratory chain complex IV subunit 1 protein content (MTCO1; Fig.8.1B). Of note, the presence of residual amounts of LRPPRC is likely attributable to liver regeneration as previously described [11]. Our results are however still consistent with one of our previous study [13].

Throughout the entire follow-up, homozygous KO mice had reduced body weight compared to their respective controls (Fig.8.1C). Despite a lower weight in KO females, significance was only reached in KO males. However, KO males had similar weight gain compared to their controls (Fig.8.1D). This was not observed in KO females which showed a lower, although not significant, weight gain suggesting a mild growth delay. Of note, the weight of WT mice was subject to sexual dimorphism, a pattern that was maintained in KOs. Consistent with these results, the absence of increased lipogenic tissue mass (white adipose tissue, WAT; Fig.8.1G) corroborated the absence of obesity in KO mice.

To rule out the effect of diet and food intake on the observed phenotype, the daily food intake (Fig.8.1E) of mice and their ability to assimilate food (weight gain/calorie intake; Fig.8.1F) were calculated. As shown in Fig.8.1E, except for a significant decrease at 7 weeks in KO males, no other major differences were found in daily food intake. Furthermore, KO mice had a similar profile to their controls suggesting that despite a somewhat different daily intake, they would not have a problem assimilating calories. This difference was however more evident in KO males than in KO females, as they displayed an increased, although not significant, weight gain/calorie intake curve compared to their controls. Together these results indicates that the phenotype of *Lrpprc* deficient mice cannot be explained by a difference in food intake. Furthermore, since the knockout is liver specific, it is possible that KO mice have a higher energy expenditure which could therefore explain the lack of difference in food intake despite a lower weight in KOs.

To better understand the nutritional and health status of the *Lrpprc* KO mice, anthropometric parameters at 14 weeks were assessed. Normalized to the tibia's length, liver mass of KO males was 18% smaller than their controls (Fig.8.1G). This significant decrease was however lost when normalized to body mass (Supplementary Table 9.2) indicating that even though the loss of LRPPRC seems to affect liver mass, this

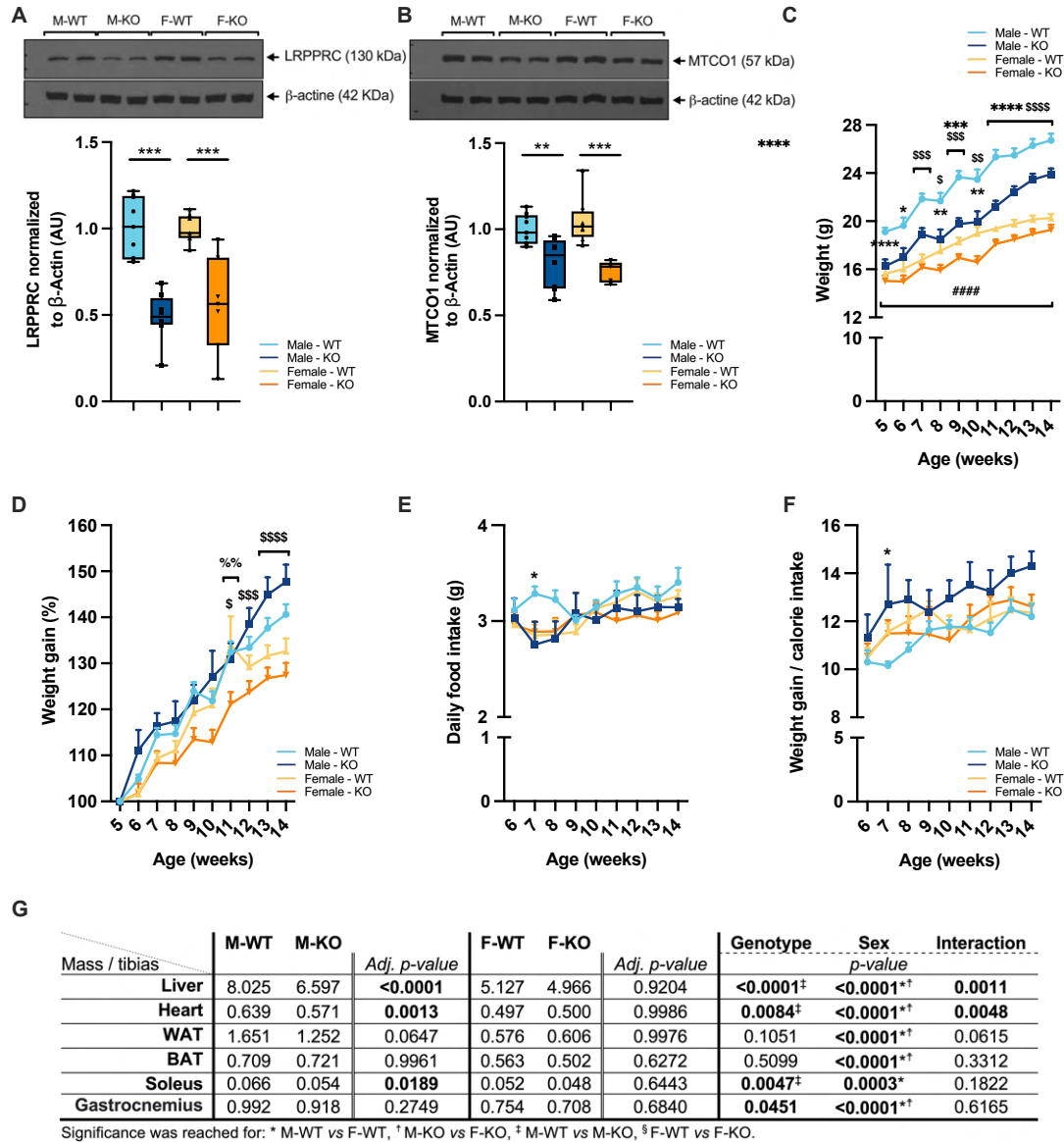


Fig. 8.1. General phenotype in normal and liver-specific LRPPRC deficient mice. Immunoblots of **(A)** LRPPRC, and **(B)** MTCO1 content in the liver (n=8/group). Actin was used as loading control. **(C)** Mice weight and their **(D)** weight gain (in %) were taken and calculated once a week (N=40, 10/group). **(E)** Daily food intake, and **(F)** calorie assimilation represented by weight gain on daily caloric intake were also calculated once a week (n=10). **(G)** At 14 weeks of age, organ mass normalized to tibia length were calculated (n=10). The table represents the average mass for each group and organ. The adjusted p-value and the impact of sex and genotype are also shown. Difference between WT and KO mice was assessed with a two-way ANOVA following by Šidák (A-B, G) or Tukey (C-F) multiple comparison post hoc analysis : * $p < 0.05$, ** $p < 0.002$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. For panels C-F, significant differences between groups are symbolized: #, Male WT vs. Female WT; \$, Male KO vs. Female KO; *, Male WT vs. Male KO; %, Female WT vs. Female KO. Adj. p-value: adjusted p-value.

decline was probably not explained by liver atrophy. No changes were seen in KO females. This pattern was also found for the heart and soleus, two oxidative muscles (Fig.8.1G). Indeed, heart and soleus mass were decreased by 11% and 18% respectively in KO males compared to WT. However, this significant difference was only present when normalizing to tibia length suggesting once again that this loss of mass is probably not related to muscle atrophy but rather to a retarded growth (Supplementary Table 9.2). This result was not only consistent with a previous study [11], but also with the LRPPRC mutation found in humans where a growth delay is well documented [22, 23, 24]. No difference was noted in KO females. Interestingly, the mass of the gastrocnemius, a glycolytic muscle, was unchanged in both sex (Fig.8.1G). Finally, the mass of lipogenic tissue – white (WAT), and brown (BAT) adipose tissues – were unchanged regardless of genotype (Fig.8.1G). It should be noted that the absence of an increased WAT mass was consistent with body weight follow-up, demonstrating the absence of obesity in this model. Altogether, these results corroborated those previously obtained at 5 weeks of age [11], and confirmed the lack of obesity in our model, which can be characterized as "lean". Of note, because our facilities could not accommodate thermoregulated chambers, mice were housed at an ambient temperature below 30°C (rooms tempered at 22°C), which can impact energy expenditure by increasing it to regulate body temperature [25]. Thermogenesis upregulation could therefore influence body weight gain.

8.2. Loss of hepatic LRPPRC results in deleterious liver remodeling regardless of sex

To assess and validate the liver phenotype, a series of histological and molecular analyses were performed. Following HPS staining and qualitative observations, livers lacked structure and organization in KO males and females in a similar way compared to their controls (Fig.8.2A). Surprisingly, no microvesicular steatosis was evidenced following Oil Red'O staining (Fig.8.2A and B) as this was previously seen at 5 weeks of age [11]. To assess hepatocellular injury, alanine and aspartate aminotransferases (ALT and AST) activities were measured. AST, produced in hepatocytes as well as in muscle and heart cells, was not significantly different (Fig.8.2C). ALT, produced mainly but not exclusively in hepatocytes, was however significantly increased by 1.29-fold in KO males (Fig.8.2D). No significant changes were observed in KO females despite a significant sex impact ($p=0.0002$). To further identify the extent of liver damage, several hepatic markers were targeted. Fibrosis marker *Col1a1*, and matrix remodeling marker *Mmp2* were first quantified. *Col1a1* expression was significantly increased by 2.28- and 1.77-fold in males and females KO respectively (Fig.8.2E). Consistent with

this result, *Mmp2* expression was increased by 2.35-fold in KO males and by 1.60-fold in KO females (Fig.8.2F) suggesting matrix remodeling of the liver with the presence of fibrosis. Inflammatory markers *Ccl2* and *Tgf β* were then assessed. As shown in Fig.8.2G, *Ccl2* expression was once again significantly and similarly increased in both KO males and females (1.59- and 1.84-fold respectively). This was not the case for *Tgf β* expression since only KO males showed a significant increase of 1.37-fold (Fig.8.2H). The presence of liver damages and remodeling led us to look at some markers of endoplasmic reticulum (ER) stress. *Chop* expression was significantly increased in KO males (1.71-fold) whereas KO females had a similar increase, but without reaching statistical difference ($p=0.1612$; Fig.8.2I). However, the expression of *Grp78* was decreased by 0.51-fold in KO males, but slightly increased in their female counterparts (1.30-fold, $p=0.2598$; Fig.8.2J). This has been observed and associated with fibrosis and the exacerbation of liver diseases in mice [26]. Overall, these results suggest remodeling of the liver matrix with signs of fibrosis and inflammation that are independent of sex for most of the analyzed parameters. Moreover, the absence of lipid droplets implied that the liver of both KO males and females was probably at a more advanced stage than steatosis. It should be noted that a significant decrease in circulating cortisol was observed in KO females (0.42-fold, Fig.8.2K) which has previously been reported in patients with more advanced stages of NAFLD [27].

To dig deeper into the hepatic signature of our *Lrp1rc*-null mice and whether there could be a transcriptomic sexual dimorphism, RNA-sequencing analysis was performed. As shown in Fig.8.3, the liver transcriptome signature of KO mice was significantly impacted by sex. Males are especially characterized by decreased transcript markers of mitochondrial inner membrane organization and impaired oxidative phosphorylation (Fig.8.3A). Consistently, purine ribonucleoside triphosphate biosynthetic process was also decreased. As for KO females, they showed a decrease of transcript markers for i) the regulation of glucose metabolism ii) the metabolism of ribonucleoside biphosphate and acetyl-CoA and iii) the processes for fatty acid transfer and biosynthesis as well as triglycerides metabolism (Fig.8.3B). Some similarities were however found in both sexes. Both KO males and females showed a decrease in transcripts involved in the metabolism of i) α -amino acids, ii) plasma lipoproteins and cholesterol and iii) fatty acids and triglycerides catabolism. It should be noted that the analyses revealed only 8 transcripts (0.08% of all transcripts) expressed in a different and significant way between KO males and females (as opposed to 165 transcripts between WT (1.654% of all transcripts)(Supplementary Table 9.3). Altogether, these results suggest a sexual dimorphism in the hepatic expression of certain transcripts.

While KO males showed a decrease in transcripts involved in mitochondrial organization and its phosphorylative capacity, females KO had a more pronounced decrease in transcripts involved in lipid metabolism.

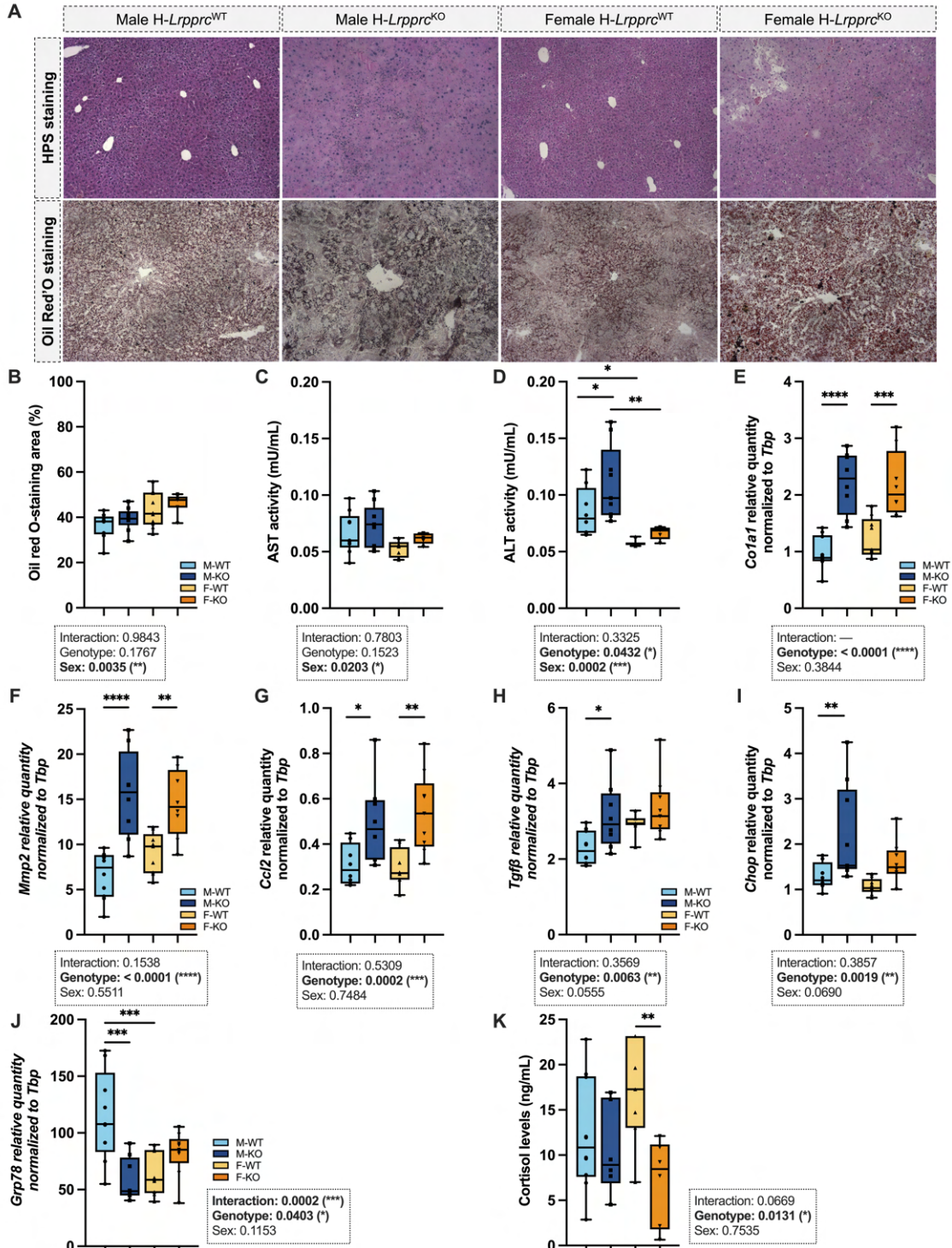


Fig. 8.2. Liver phenotype in normal and liver-specific LRPPRC deficient mice. (A) Representative images of HPS and Oil Red O stainings in livers from WT and KO mice. **(B)** Oil Red O staining area was quantified in hepatocytes from *Lrpprc* WT and KO livers (n=10/group). The activity of **(C)** aspartate and **(D)** alanine aminotransferases were measured (n=5-10/group), and several hepatic markers were quantified by RT-qPCR (n=9-10/group): **(E)** *Col1a1* for fibrosis, **(F)** *Mmp2* for matrix remodeling, **(G)** *Ccl2* and **(H)** *Tgf β* for inflammation, **(I)** *Grp78* and **(J)** *Chop* for ER stress. **(K)** Circulating cortisol levels were quantified (n=6-10/group). Difference between WT and KO mice was assessed with a two-way ANOVA following by Šidák multiple comparison post hoc analysis : * $p < 0.05$, ** $p < 0.002$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. The source of variation is indicated below each graphs.

Since the transcriptional profile of KO mice showed hepatic alteration of transcripts associated with cholesterol and plasma lipoprotein metabolism, this prompted us to measure total cholesterol in plasma lipoprotein fractions (Fig.8.3C-D). Compared to their respective controls KO females exhibited lower concentrations of VLDL-C and IDL/LDL-C whereas KO males showed increased levels (Fig.8.3D). As the endogenous lipoprotein pathways begins in the liver with the formation of VLDL, it is worth noting that the liver transcriptome of KO both males and females showed a decrease in several apolipoprotein- associated transcripts synthesized in the liver (e.g. *Apoa1/2*, *Apob*, *Apoc1/2/3*, *ApoE*; data not shown). Interestingly, *Apoc1/3* and *Apoa5* transcripts – synthesized and secreted from the liver amongst other tissues [28, 29, 30] – were only decreased in KO male (data not shown) suggesting a potential link with increased circulating VLDL-C and IDL/LDL-C [31]. However, a decrease in *Pcsk9* transcripts, whose levels are regulating the rate of degradation of LDL receptors, was observed in KO female suggesting a potential association with decreased circulating LDL-C. Finally, HDL concentration was decreased in both KO males and females, but more so in females (Fig.8.3C-D). Since ApoA-I and -II are the core structural proteins of HDL, it is interesting to mention that the decrease in their transcriptional levels may have impacted the HDL profile in KO mice. No changes were observed in the larger fraction (chylomicron remnants and/or large VLDL; noted as CR) concentrations (Fig.8.3C-D). However, with these results and since we haven't looked at the intestinal and hepatic absorption, the liver secretion or the clearance by the WAT, we cannot rule out the hypothesis that hepatic loss of LRPPRC doesn't have an impact on these processes.

8.3. Loss of hepatic LRPPRC induces disruptions in glucose metabolism in both sexes, but predominantly in males

Since in this model the loss of LRPPRC is specific to the liver, a key organ for gluconeogenesis, glucose metabolism was of natural interest. A 14-weeks blood glucose

follow-up showed that both KO males and females displayed a hypoglycemic profile after a 5h-fast compared to their respective controls (Fig.8.4A). Males were however more affected. When we looked at insulin levels, the hypoglycemic profile was associated with an insulin deficiency highlighted by a significant decrease (0.42-fold in

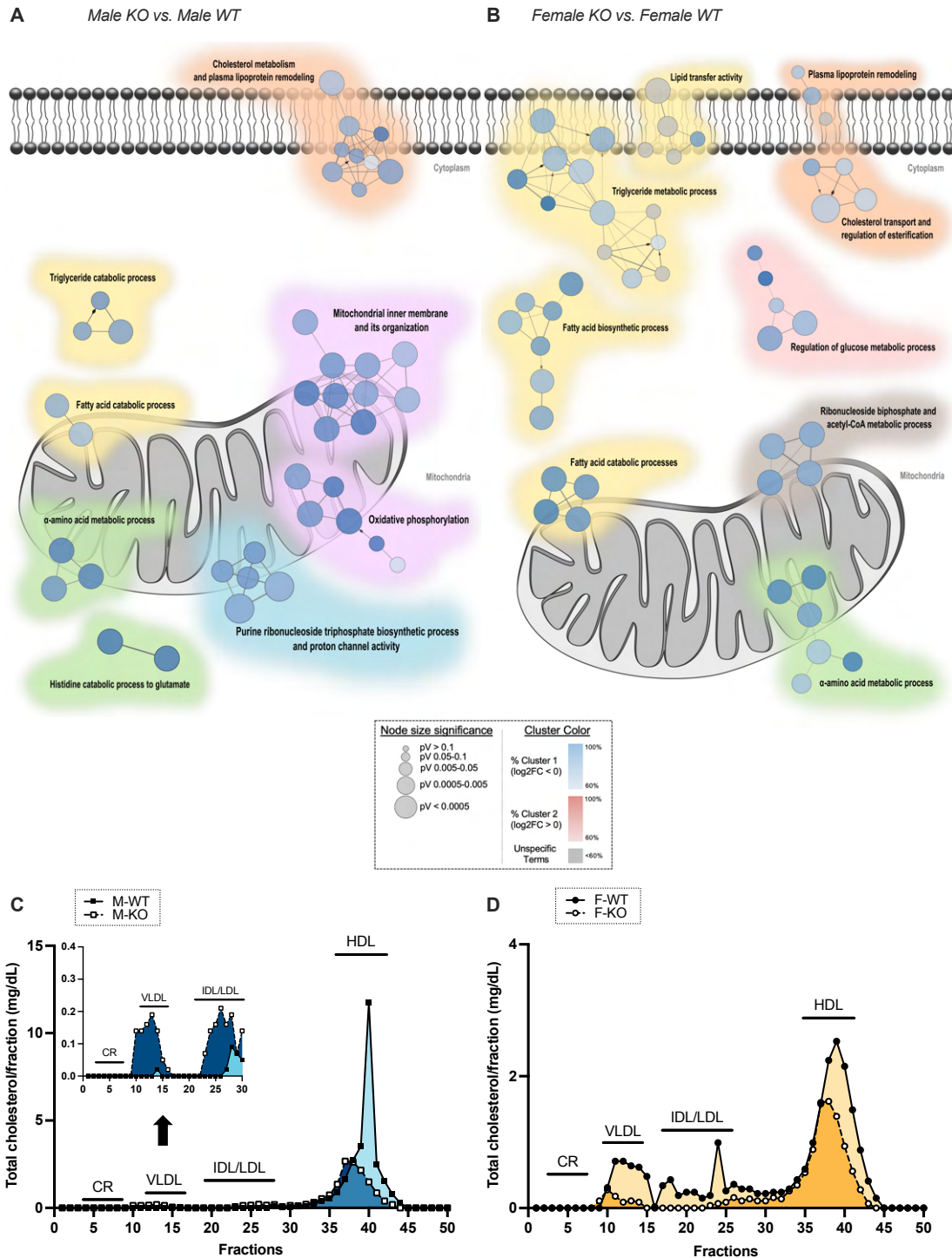


Fig. 8.3. RNA-sequencing analysis in the liver and total cholesterol level in plasma lipoprotein fraction of normal and liver-specific LRPPRC deficient mice.

The liver transcriptomic signature of **(A)** KO male and **(B)** KO female compared to their respective control (n=10). Transcripts were classified as down- (blue, cluster #1) or up-regulated (red, cluster #2) based on their log₂ fold-change. For each comparison, the Cytoscape ClueGO plugin was used to cluster transcripts significantly enriched following enrichment analyses of GO terms (Molecular Function, Cellular Component, and Biological Process) and pathways (KEGG database). The size of the nodes reflected the statistical significance of the terms (pV). The node color showed the proportion of transcripts from each cluster that are associated to the term. Difference between WT and KO mice was assessed with a classical Fisher's exact test following by a Bonferroni step-down multiple comparison post hoc analysis. Only metabolic pathways with a $pV \leq 0.05$ are shown here. Plasma from fed-mice at 14 weeks of age was pooled and subjected to gel filtration by FPLC. Total cholesterol in each lipoprotein fraction (total of 60) was measured in **(C)** males (n=4/group), and **(D)** females (n=4/group) mice.

males, and 0.46-fold in females) at 9 weeks of age (Fig.8.4A1). At 14 weeks, this pattern was still observed in fed KO males (0.57-fold), but no changes were found in KO females.

To gain further insight into the difference between *Lrprrc* WT and KO mice, an ITT was performed after a 5-h fast to assess insulin sensitivity. As shown in Fig.8.4B, both KO males and females demonstrated a lower area under the curve (AUC) for glycemia compared to their controls (0.66- and 0.69-fold respectively). However, only the profile of KO males was significantly affected indicating a higher insulin sensitivity than their female counterparts.

We next assessed the ability to secrete insulin in response to a bolus of glucose by performing an OGTT following a 16-h fast. KO males demonstrated a sudden decrease in glucose levels at 30 minutes post-gavage resulting in a decrease of 0.84-fold AUC compared to their controls (Fig.8.4C). Insulin levels between 0- and 30-minutes post-gavage were not significantly increased in KO males. In contrast, after 30 minutes KO males had lower insulin levels as seen by a 0.48-fold decrease compared to WT males. Consistent with the precedent results, no significant changes were found in KO females in response to this glucose challenge.

Overall, KO males were more affected than their female counterparts: they displayed pronounced fasting hypoglycemia and had increased and persistent insulin sensitivity over a 14-week follow-up. This was consistent with the ITT and OGTT results where KO males exhibited insulin hypersensitivity associated with enhanced peripheral glucose reuptake.

In order to identify potential mechanisms to this insulin hypersensitivity and hypoglycemic profile, we targeted key enzymes of gluconeogenesis, and glycogenesis (Supplementary Fig.14.1). It is worth noting that even though no significant changes were

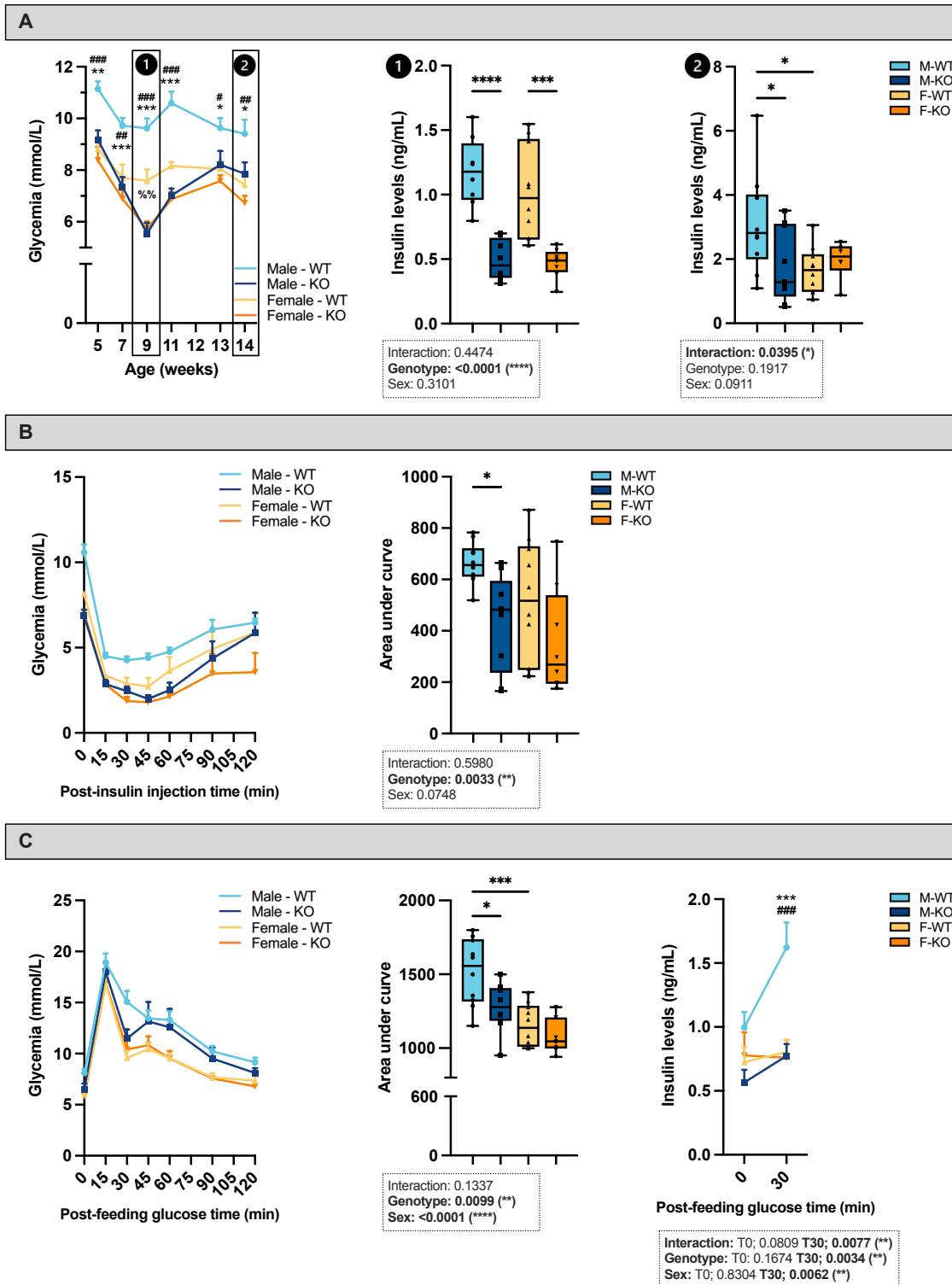


Fig. 8.4. Glucose metabolism in normal and liver-specific LRPPRC deficient mice. **(A)** Blood glucose was monitored during 14 weeks, and insulinemia was quantified at (1) 9 and (2) 14 weeks (N=40, 10/group). **(B)** An ITT was performed at 11 weeks after a 5-hour fast to assess insulin sensitivity with the blood glucose curves (right), and the areas under the curves (left). **(C)** An OGTT was then performed at 12 weeks after a 16-hour fast to estimate the ability to secrete insulin in response to a bolus of glucose with the blood glucose curves (right), and the areas under the curves (middle). Insulinemia was measured before the test (T0), and 30 minutes after glucose administration (T30) (right). Difference between WT and KO mice was assessed with a two-way ANOVA following by Tukey (A) or Šidák (B-C) multiple comparison post hoc analysis : * $p < 0.05$, ** $p < 0.002$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. For panel A, significant differences between groups are symbolized: #, Male WT vs. Female WT; \$, Male KO vs. Female KO; *, Male WT vs. Male KO; %, Female WT vs. Female KO. The source of variation is indicated below each graphs.

observed, PEPCCK content – the rate limiting enzyme of neoglucogenesis – was modestly decreased in the liver of KO males. No changes were found in KO females. Interestingly, this pattern was reversed in glycogen synthase (GS) content, a key enzyme of glycogenesis : compared to their respective controls, a 0.67-fold decrease was observed in KO females while males did not exhibited any changes.

8.4. Loss of hepatic LRPPRC leads to a remodeling of the cardiac lipidome

First and foremost, the hepato-specificity of our KO model was validated by the lack of change in cardiac LRPPRC content, regardless of sex (Fig.8.5A). We thereby sought to determine whether the cardiac lipidome was affected considering the fact that hepatic lipid metabolism alterations eventually lead to a remodeling of circulating lipid levels as previously seen with our liver-specific *Lrpprc*-null mice [13], but also with our plasma lipoprotein profile (e.g. decreased HDL-C that may promote lipidomic changes in extra-hepatic tissues). Figure 8.5B shows a volcano plot of all 2214 MS features of the data set. Using a subjective corrected p-value threshold of 0.1 (corresponding to an uncorrected p-value of 0.007), 162 features discriminated KO from control mice, of which 46 lipids were subsequently identified by MS/MS (Fig.8.5B; data not shown). Out of 31 glycerophospholipids (GPL) identified, 18 GPLs (Fig.8.5C), and 10 ether lipids (Fig.8.5D) were decreased (0.30- to 0.88-fold and 0.30- to 0.74-fold, respectively). Changes in GPLs levels were slightly impacted by sex with KO females having a greater decrease in phosphatidylcholines (PC), and phosphatidylethanolamines (PE) than their male counterparts (data now shown). Since GPLs are involved in cardiolipin maturation, targeting and identifying them was one of our objectives. Only CL(76:12)

was significantly decreased in KO mice (0.59- fold; Fig.8.5E), and no sex impact was found. Finally, 15 glycerolipids were identified (Fig.8.5F). Interestingly, triglycerides with up to 58 carbons were all significantly increased in female KO while those with more than 60 carbons were significantly decreased. Although less pronounced, this pattern was also observed in KO males with a significant decrease in longer-chain triglycerides levels ($\geq 60C$), but no significant changes in shorter-chain triglycerides ($\leq 58C$) (data not shown). Overall, these results demonstrate significant remodeling of the cardiac lipidome in both sexes, but with KO females being more affected than their male counterparts.

8.5. Loss of hepatic LRPPRC induces mitochondrial remodeling mainly in females' hearts

Changes in the lipidome and the significant decrease of cardiolipin 76:12 in KO's hearts prompted us to look at the mitochondrial life cycle. We first targeted mitochondrial biogenesis by quantifying mitochondrial transcription factor A (*Tfam*) gene expression. As shown in Fig.8.6A, a significant 0.73-fold decrease was only observed in females KO. No changes were found in KO males. We then sought to look at the impact of *Lrpprc* hepatic deletion on mitochondrial dynamics. The expression of the mitochondrial fission genes *Mff* and *Drp1* were slightly impacted by the hepatic loss of LRPPRC (Fig.8.6B). In fact, no changes were found in the expression of *Mff*, and *Drp1* was significantly decreased by 0.72- fold in KO males. The expression of mitochondrial fusion genes was however significantly impacted. As shown in Fig.8.6C, the expression of *Mfn1*, *Mfn2*, and *Opa1* were decreased by 0.70, 0.63, and 0.84-fold respectively, and only in KO female. Of note, biogenesis, and fusion markers were presenting a sexual dimorphism in KO mice. These results indicates that hepatic loss of LRPPRC may affect the integrity of cardiac mitochondria predominantly in females. We also investigated whether the fatty acid metabolism was impaired in KO mice. We first targeted the nuclear receptor *Ppar α* , a coordinator of the translational cascade of proteins involved in fatty acid metabolism, amongst other metabolic pathways. As shown in Fig.8.7A, the expression of *Ppar α* is significantly decreased by 0.75-fold in KO females. The gene expression of several fatty acid transporters was then quantified. *Cd36*, *Cpt1b*, and *Cpt2* were decreased by 0.79-, 0.74-, and 0.76-fold respectively only in the heart of KO females (Fig.8.7B). Transcript levels for β -oxidation actors were also quantified. Consistent with the previous results, *Vlcad*, *Lcad*, and *Mcad* were significantly decreased only in KO females (0.75-, 0.57-, and 0.75-fold respectively) (Fig.8.7C). Interestingly and consistent with an impairment in the integrity of mitochondria, genes markers of fatty acid transport and oxidation were marked by a

strong sexual dimorphism in KO mice. To functionally validate our molecular results isolated mitochondria from cardiomyocytes underwent fatty acid-stimulated respiration in presence of i) palmitoyl-CoA, and ii) palmitoyl-carnitine (Fig.8.7D). Consistent with our results, mitochondrial respiration in KO females was reduced by 0.74-, and 0.58-fold in the presence of palmitoyl-CoA, and palmitoyl-carnitine respectively. As expected, no changes were seen in KO males.

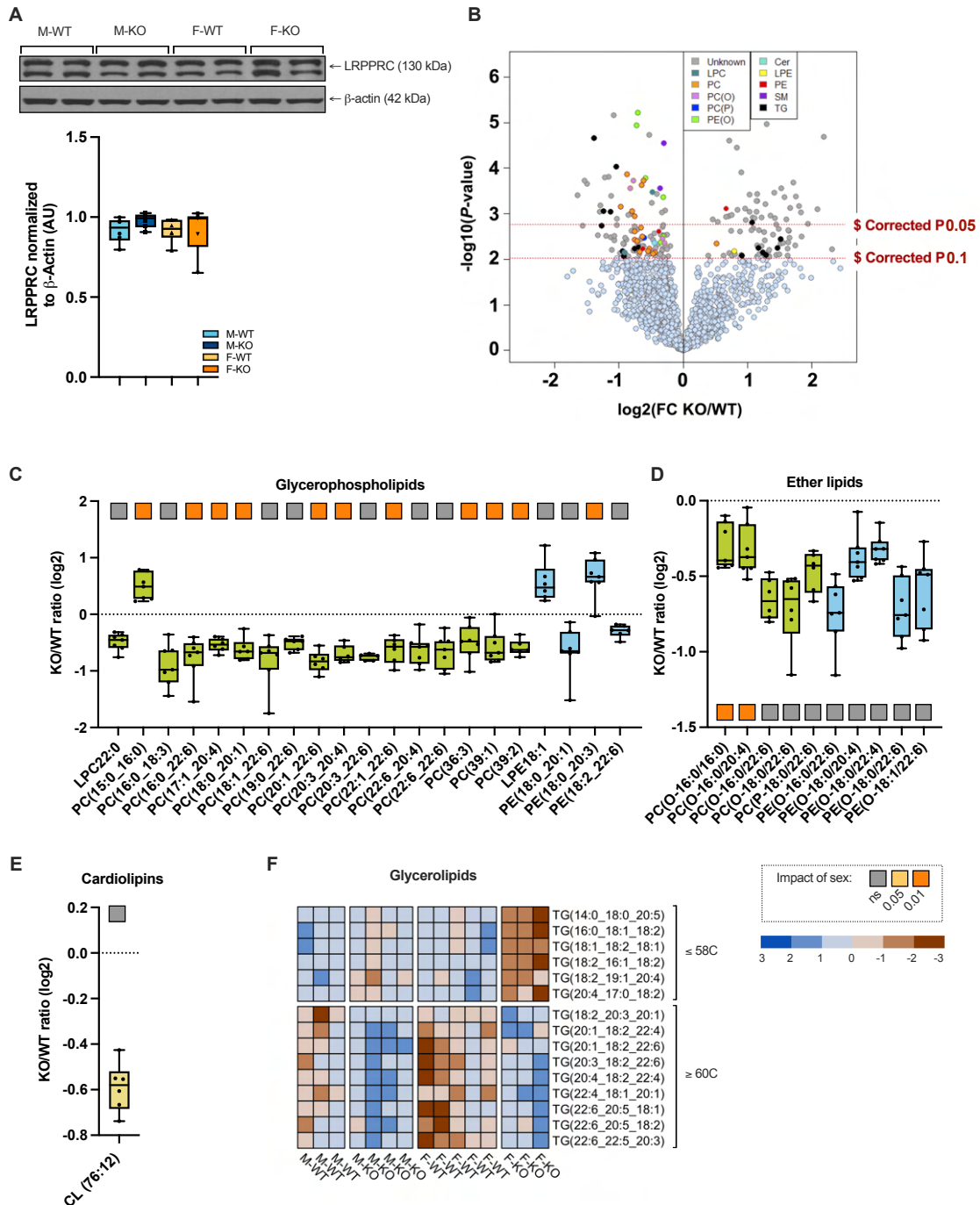


Fig. 8.5. Untargeted lipidomic in hearts of normal and liver-specific LRPPRC deficient mice. (A) Immunoblot of LRPPRC content in the heart (n=10/group). Actin was used as loading control. (B) Volcano plot from LC-QTOF-based untargeted lipidomic of hearts from *Lrpprc* KO and control mice (n=7-8/group) depicting the 2214 MS features obtained following MS data processing. The x axis corresponds to fold changes (FCs) of MS signal intensity values for all of these features in *Lrpprc* KO vs. control mice (log2). The y axis corresponds to the p values (-log10). Using a corrected p value (corrected P) threshold of 0.1 and 0.05 (horizontal red dotted lines), 162 MS features significantly discriminated *Lrpprc* KO from controls mice. See also supplementary table S9 for the list of lipids identified by MS/MS with FCs and p values (paired Student's t test followed by Benjamini-Hochberg correction). (C-F) Box plots of selected lipids significantly ($p\text{-corr} < 0.1$) discriminating KO from controls mice, and identified by MS/MS using LC-QTOF. Each dot represents a log2-transformed KO/WT signal intensity ratio (n=7-8/group) for the indicated lipid (sub)classes with their acyl side chain(s) – (C) glycerophospholipids : lysophosphatidylcholine (LPC) and phosphatidylcholine (PC) in green, lysophosphatidylethanolamine (LPE) and phosphatidylethanolamine (PE) in blue, (D) ether lipids, (E) cardiolipin (CL) 76:12, and (F) glycerolipids (triacylglycerol; TG). The underscore symbol “_” beside the acyl side chain for PCs, PEs, and TGs refers to acyl chains for which the sn position remains to be ascertained. Difference between WT and KO mice was assessed with a paired Student's t test: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ before and $p\text{-corr} < 0.05$ after Benjamini-Hochberg correction. Covariance analyses were performed to test the impact of sex, and are represented by colored squares under each lipid.

Taken together, these results suggest that *Lrpprc* deficiency has a direct impact on mitochondrial integrity, and fatty acid oxidation capacity predominantly in hearts of KO females. However, KO males seem to be somewhat protected from this cardiometabolic impairment. These results are consistent with those obtained by mass spectrometry which demonstrated remodeling of the cardiac lipidome, with intracardiac accumulation of certain triglycerides, predominantly in KO females (Fig.8.5C).

8.6. Loss of hepatic LRPPRC causes impairment of cardiac diastolic function only in males

Since the hepatic loss of LRPPRC had an impact on the bioenergetic capacities of KO females, we sought to see whether this was affecting cardiac function. A Millar catheter was therefore used to acquire the parameters of arterial in the carotid artery, and left intraventricular pressure. As shown in Fig.8.8A, the maximum arterial pressure (Pmax) was 0.89-fold decreased in KO males compared to their controls. Otherwise, the minimum arterial pressure (Pmin), and every other parameter of systolic function (CT, Pmax, Pes, MSP, dPmax) did not vary in KO mice, and regardless of sex. However, this was not the case for diastolic parameters. In fact, the minimum pressure ($0.778 \pm$

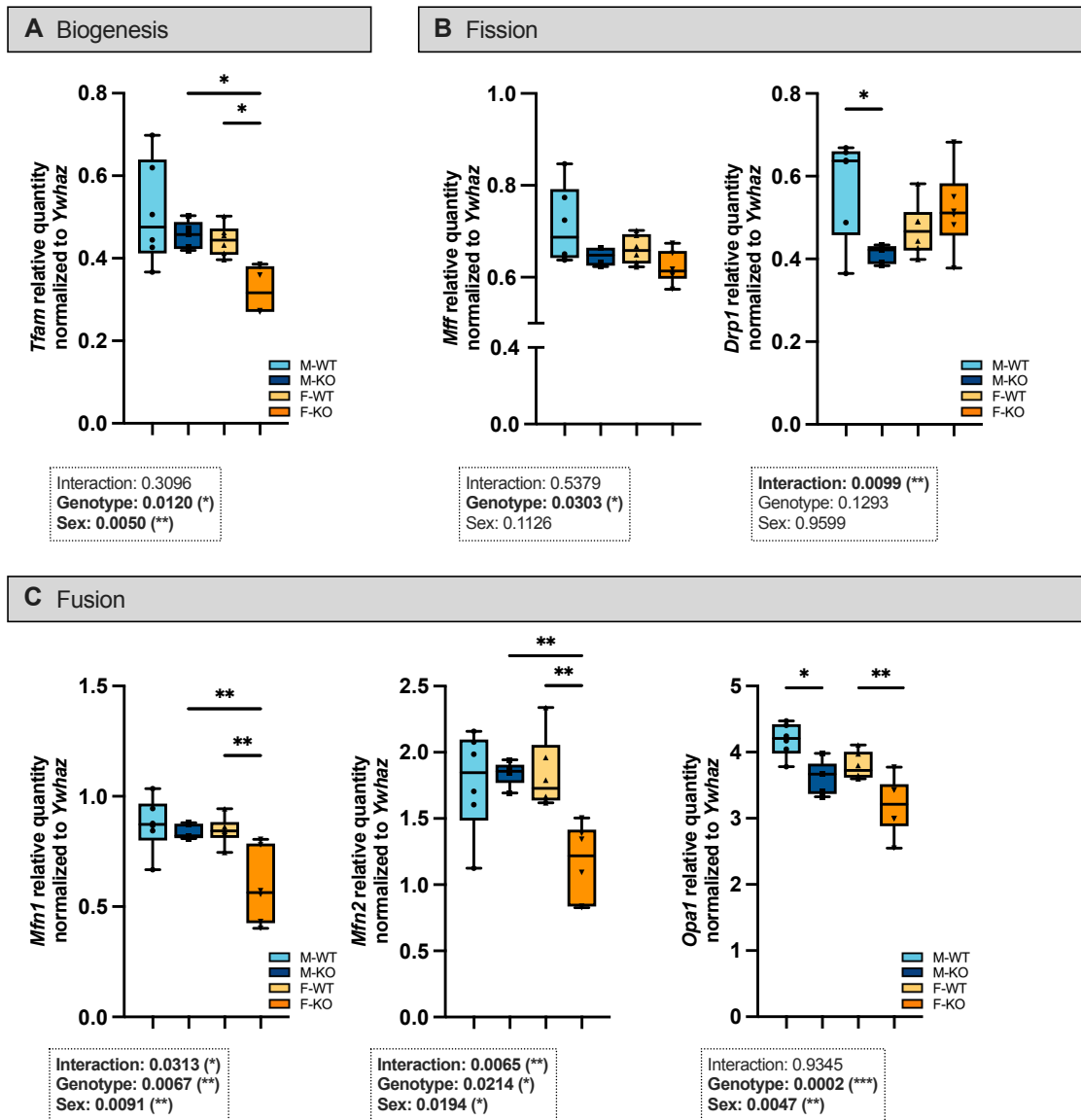


Fig. 8.6. Mitochondrial life cycle in hearts of normal and liver-specific LRPPRC deficient mice. At 14 weeks of age, the gene expression of **(A)** *Tfam*, a mitochondrial biogenesis marker was quantified (n=8/group). Markers of mitochondrial **(B)** fission : (a) *Mff* and (b) *Drp1*, and **(C)** fusion : (a) *Mfn1*, (b) *Mfn2*, and (c) *Opa1* were also quantified (n=8/group). Difference between WT and KO mice was assessed with a two-way ANOVA following by Šidák multiple comparison post hoc analysis : * $p < 0.05$, ** $p < 0.002$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. The source of variation is indicated below each graphs.

1.047) as well as the beginning-, mean-, and end-diastolic pressures were all increased in males KO (0.766 ± 1.035 ; 6.830 ± 2.224 ; 6.019 ± 1.178 respectively). No changes were found in KO females. In addition, ECG results showed that the amplitude of the QRS complex tended to increase by 1.11-fold in KO males ($p=0.0792$; Fig.8.8I). The interaction between genotype and sex was however significant ($p=0.0467$). Because

alterations in diastolic function can be explained by the presence of fibrosis amongst other causes, this hypothesis was addressed. Despite a trend toward increased fibrotic markers in males (*Col1a1*: $p=0.1205$, and *Col3a1*: $p=0.0513$; Supplementary Fig. 9.2), no difference was noted in histological quantification (Supplementary Fig. 9.2).

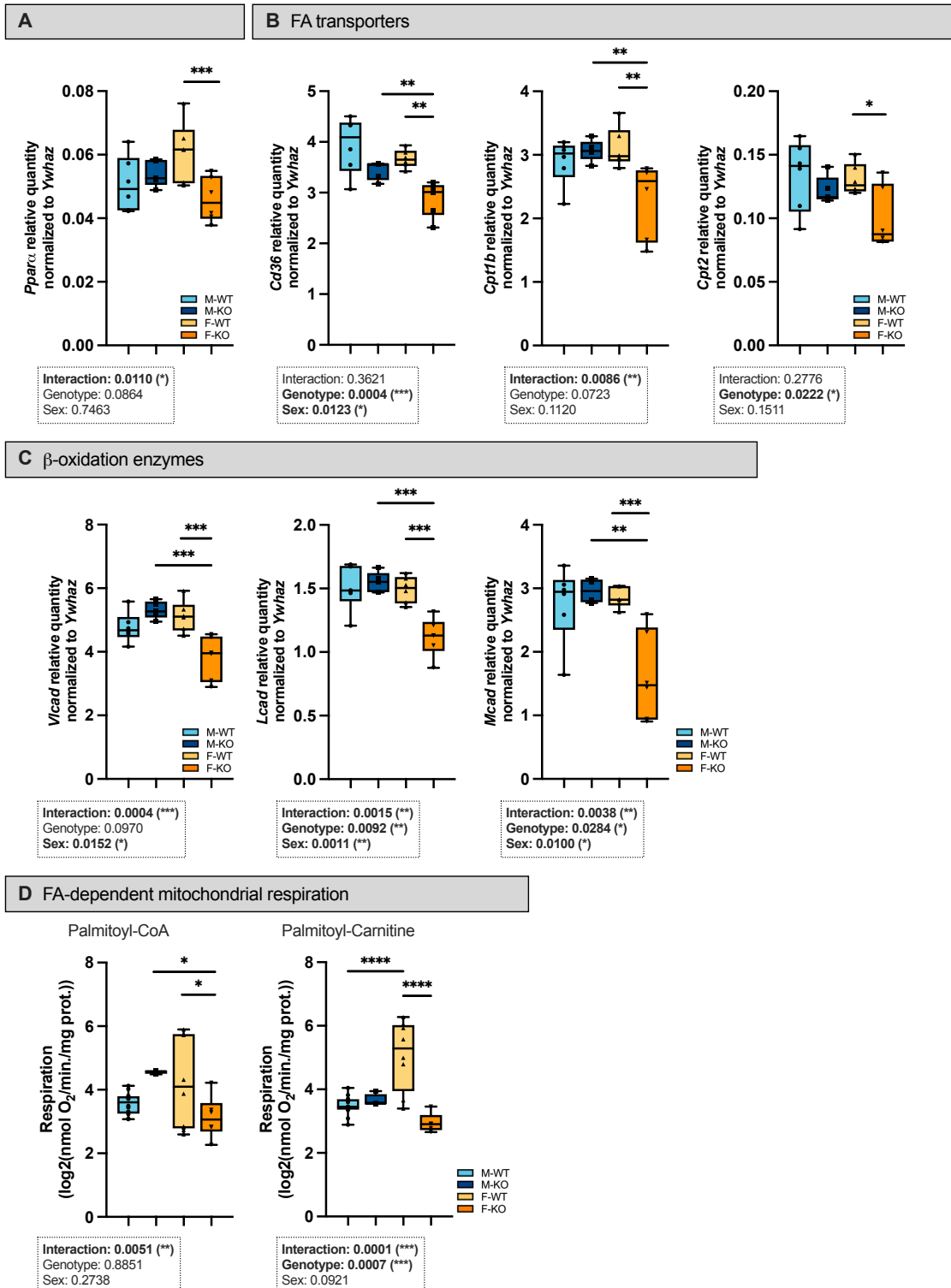


Fig. 8.7. Mitochondrial fatty acid metabolism in hearts of normal and liver-specific LRPPRC deficient mice. At 14 weeks of age, gene expression of several proteins involved in cardiac fatty acid metabolism were measured (n=8/group). **(A)** *Ppar α* , a nuclear receptor functioning as a transcription factor; **(B)** *Cd36*, *Cpt1b*, and *Cpt2*; 3 mitochondrial fatty acids (FAs) transporters; and **(C)** *Vlcad*, *Lcad*, and *Mcad*; enzymes implicated in mitochondrial β -oxidation. **(D)** Mitochondrial respiration in the presence of (a) palmitoyl-CoA and (b) palmitoyl-carnitine was also studied (n=6-8/group). Difference between WT and KO mice was assessed with a two-way ANOVA following by Šídák multiple comparison post hoc analysis : * $p < 0.05$, ** $p < 0.002$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. The source of variation is indicated below each graphs.

No changes were detected in KO females. Interestingly, a significant decrease in *Tgfb1* level was observed in KO females which was consistent with the absence of fibrosis (Supplementary Fig. 9.2, [32]).

9. Discussion

The aim of this study was to characterize the cardiac abnormalities of lean NAFLD, and assess the impact of sex using a liver-specific *Lrpprc*-null mouse model. *Lrpprc* KO mice were followed from 5 to 14 weeks of age, and evaluated at the hepatic, circulatory and cardiac levels. Our results reveal that specific loss of LRPPRC in the liver does not lead to obesity but induces deleterious remodeling of the liver matrix with signs of fibrosis and inflammation similar in both sexes recapitulating to some extent the lean-NAFLD phenotype. Importantly, loss of hepatic LRPPRC goes beyond liver damage and results in a pronounced sex-dependent multi-faceted phenotypic remodeling. KO mice are exhibiting disturbances in glucose metabolism with fasting hypoglycemia and increased insulin sensitivity which are predominantly found in males. KO mice are displaying cardiac abnormalities with females showing cardiometabolic impairments whereas males are manifesting signs of mild diastolic dysfunction. This study gives new insight into the crucial involvement of mitochondria in the pathophysiological of NAFLD in the lean population and its cardiac impact.

9.1. Loss of hepatic LRPPRC induces advanced liver defects similar in both males and females

So far, only one study reporting anthropometric parameters has been published showing that, at 5 weeks of age, liver-specific *Lrpprc* KO mice exhibited reduced body weight despite its normal appearance and locomotor activity under normal cage bound conditions [11]. Consistently, our data showed that in addition to having a

reduced weight at 5 weeks, the weight curve was maintained until 14 weeks regardless of sex. In the literature, patients harboring mutations in the *Lrpprc* gene present cerebral manifestations such as midbrain lesions, where the pituitary gland is located [33]. Given that pituitary lesions have an impact on the release of growth hormone (GH) and via ACTH release on cortisol secretion [34, 35], it would be interesting to consider the possibility of cerebral manifestations in this mouse model. The latter could indeed be the cause of a decrease in cortisol levels but also of an alteration in growth and response to stress. Interestingly, the hepatic phenotype appeared to have evolved similarly in both males and females from a more steatotic liver at 5 weeks to

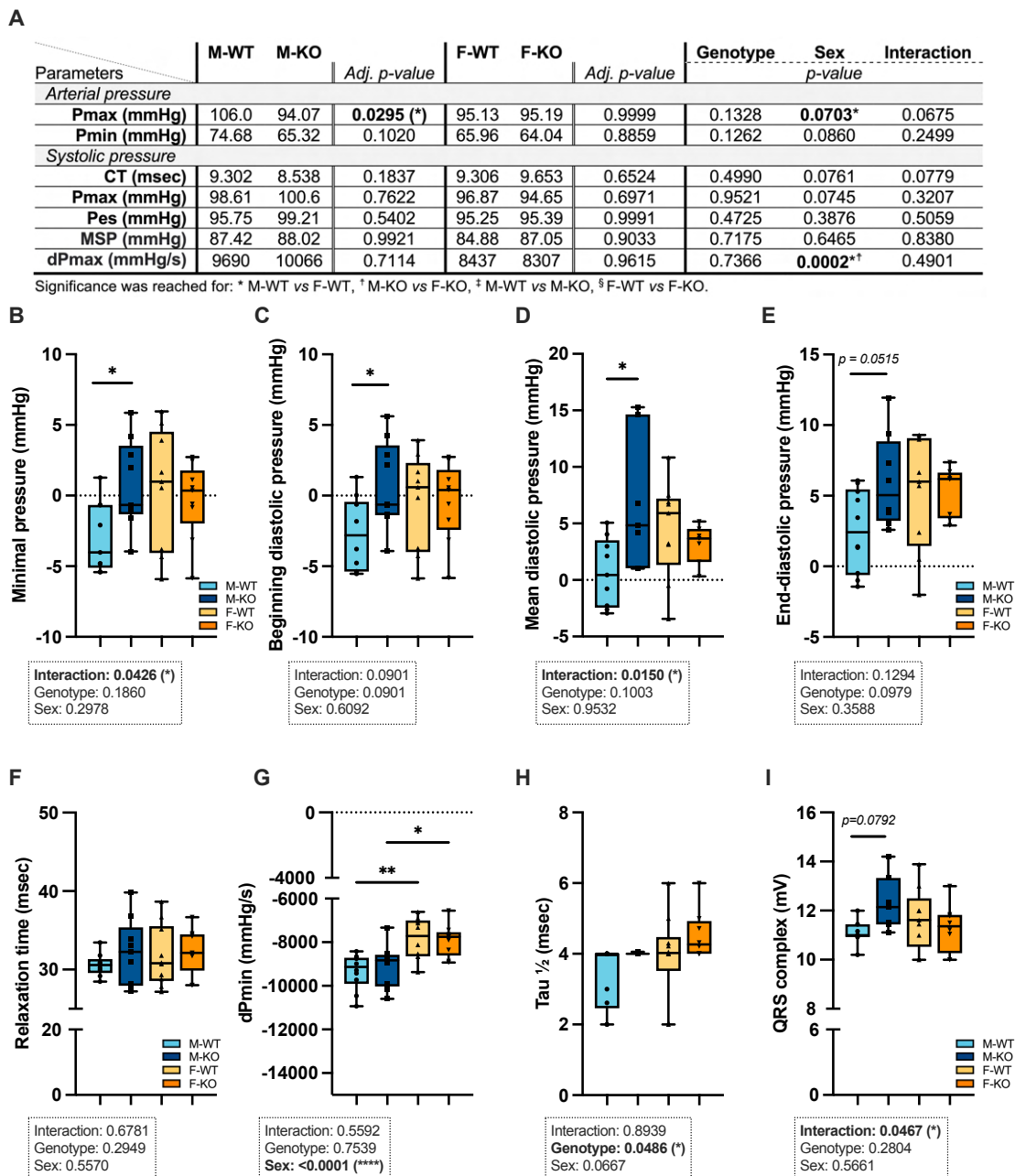


Fig. 8.8. Cardiac function studied by Millar probe in normal and liver-specific LRPPRC deficient mice. (A) Parameters of blood pressure were measured in the right carotid artery (Pmax, maximum pressure; Pmin, minimum pressure) (n=8-10/group). Once entered into the left ventricle, parameters of systolic pressure were acquired (CT, contraction time; Pmax, maximum pressure; Pes, end-systolic pressure; MSP, mean systolic pressure; dPmax, maximum developed pressure) (n=8-10/group). Different parameters of diastolic pressure was also measured (n=8-10/group) and are represented by the (B) minimal pressure, (C) beginning diastolic pressure, (D) mean diastolic pressure, (E) end-diastolic pressure, (F) relaxation time, (G) myocardial relaxation index, and (H) Tau 1/2. (I) The ECG was monitored and the amplitude of the QRS complex was analyzed (n=8-10/group). Difference between WT and KO mice was assessed with a two-way ANOVA following by Šidák multiple comparison post hoc analysis : * $p < 0.05$, ** $p < 0.002$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. The source of variation is indicated below each graphs.

a more fibrotic and inflamed liver at 14 weeks. Although these are typical histological features of severe mitochondria hepatopathy [36], increased levels of fibrosis, inflammatory and ER stress markers recapitulates what can be observed in a population with steatohepatitis (NASH), and to some extent, with early stages of cirrhosis [26, 37, 38, 39, 40].

However, our data on cortisol showed that KO females had lower circulating levels. Based on a study by Ahmed et al., there is two seemingly protective phases of altered hepatic cortisol metabolism in progressive NAFLD [41]. In steatosis, increased cortisol clearance, thus lowering its local levels, would preserve the hepatic metabolic phenotype and limit lipid accumulation. Conversely, in NASH, increased cortisol regeneration, and thus, higher local cortisol levels would possibly limit hepatic inflammation. Therefore, although it should be kept in mind that these data were generated in an obese population, our results may indicate that the KO female organism attempts to preserve the liver, hence the slight phenotypic difference between males and females. This could also explain the absence of a difference in ALT activity, a classic marker of liver damage.

Despite similar liver remodeling in both sexes, our transcriptomic data are pinpointing a sexual dimorphism suggesting the possibility of distinct mechanisms in the emergence and/or progression of this liver phenotype. While KO males showed a decrease in transcripts involved in mitochondrial organization and its phosphorylative capacity, KO females had a more pronounced decrease in transcripts involved in lipid metabolism. Although network modeling for sex differences in NAFLD is still an emerging field, our data are consistent with a recent study pinpointing perturbations of mitochondria and fatty acid biosynthesis gene expression in males and females Pparg-null mouse model respectively who were fed with chow diet [42]. Kurt et al. showed that

oxidative phosphorylation and lipid metabolism were shared between sexes, with males showing prominent lipid-related processes (e.g. phospholipids, lysophospholipids) compared to females [43]. However, since this study was based on the transcriptome of diet-induced NAFLD mice, the development and progression of the disease also depended on adipose tissue dysfunction, knowing that female sex is protected to some extent from dysmetabolism. It is worth mentioning that no study (to the best of our knowledge) has yet looked at the transcriptome of a lean-NAFLD mouse model, making our study the first to suggest the presence of a sex-dependent signature specific to lean-NAFLD without any signs of confounding systemic effects. Furthermore, NAFL/NASH patients often present different extents of dyslipidemia (low level of HDL-C, increased levels of LDL particles and triglycerides) which serve as an important non-invasive marker for NAFLD diagnostics. It has been reported that NAFLD in lean and overweight/obese population share this common lipid profile with both lean and overweight/obese controls [44]. Our results were consistent with these evidences although only male *Lrpprc* KO mice exhibited increased LDL-C levels, and decreased HDL-C levels. Even though sex was not studied separately, a previous study showed that *Lrpprc* KO mice also exhibited plasma lipidome remodeling with notably a decrease in DHA-containing PCs, and cholesteryl esters as well as free DHA [13]. However, such a lipid profile is considered atherogenic and is also linked to an increased risk of developing cardiometabolic complications [45]. Interestingly, female *Lrpprc* KO mice had a different profile with lower plasma levels of lipoproteins than their controls, a pattern that was also observed in their transcriptome. Although no analysis of TG influx and cholesterol efflux has yet been performed, these findings suggest that they may have a synthesis defect. Besides, it has been shown that a VLDL synthesis and lipid outflow from the liver were impaired in patients with NASH, but not in patients with NAFL [46].

Overall, our data suggest the presence of a similar liver phenotype across sexes, which recapitulates the damage found in NASH. However, cortisol levels, transcriptomic data, and total cholesterol in plasma lipoproteins fractions leave room for the possibility of distinct, sex-dependent mechanisms underlying lean-NAFLD progression which could therefore have an impact on the extra-hepatic manifestations.

9.2. LRPPRC deficiency disrupts glucose metabolism predominantly in males

Compared to lean populations, previous studies on NAFLD in lean people reported a higher risk of impaired glucose tolerance in mouse model and human cohorts as they either exhibit signs of type 2 diabetes and metabolic syndrome or belong to the

phenotype of “metabolically obese normal weight” (reviewed in [4, 47]). However, since our liver phenotype shows promising signs of steatohepatitis at 14 weeks, it appears that few studies on NASH in the lean population have looked at its impact on glucose metabolism.

Our data suggested that *Lrpprc* KO mice had a fasting hypoglycemic profile and insulin hypersensitivity, with this profile being exacerbated in males even after statistical correction to WT. The fact that males were more affected than females seems to be in agreement with the liver phenotype data where KO males based on increased ALT activity and no change in circulating cortisol levels – as detailed above –, would be at a somewhat slightly more advanced stage of the disease. These results have also been observed in a mouse model of MCD diet-induced steatohepatitis [48]. However, since little is known about the relationship between NASH in lean people and hypoglycemia, we speculate that the underlying mechanisms could be associated to a compensatory system on behalf of the organism.

This hypothesis is based on artificial nutrition procedures where after undernutrition and a prolonged fast, depletion of hepatic glycogen reserves followed by insulin hypersensitivity is often observed [49]. In fact, severe hepatic disturbances would impinge on glycogen storages which would weaken the liver’s capacity to initiate gluconeogenesis during a fasting period. Gluconeogenesis being inhibited by insulin, the latter would become less necessary, and therefore less secreted. Our data are in agreement with this postulate since *Lrpprc* KO mice exhibited lower insulin levels regardless of sex. This could also apply to cortisol levels which, although not specific to glycemia control, increases energy availability by directly inhibiting insulin-producing pancreatic β -cells [50]. To compensate for this insulin decrease and because euglycemia can be primarily maintained by endogenous glucose production in the liver [51], insulin-sensitive organs and tissues such as skeletal muscles would be forced to adapt by increasing their sensitivity to insulin [52]. Mice would then present a reactive hypoglycemia. However, the response of *Lrpprc* KO mice to a bolus of glucose was not similar to that observed in the severely malnourished. Generally, glucose intake would provoke insulin secretion thereby leading to a transient correction of hypoglycemia [53, 54]. When moderate, this hypoglycemia is often asymptomatic. But, in situations of insulin hypersensitivity, symptomatic hypoglycemia may occur. However, our OGTT data, rather than suggesting distinctive signs of postprandial hypoglycemia suggest a rapid reuptake (15 to 30 minutes post-gavage) of glucose by skeletal muscles.

It should be noted that during prolonged fasting period – or during energy demand – and once hepatic glycogen storages are depleted, neoglucogenesis uses amino acids, lactate, pyruvate and glycerol as substrates for de novo glucose synthesis. Known as

the Cori cycle, it could explain the struggle to maintain homeostasis between a liver with depleted glycogen reserves, and skeletal muscles that are hypersensitive to insulin and rapidly metabolizing glucose. Thus, an imbalance of metabolic substrates or an alteration in gluconeogenesis signaling pathway can lead to hypoglycemia.

Interestingly, based on the modest decrease in PEPCK content found in males *Lrpprc* KO, we can only speculate that this mechanism is a possible driver of hypoglycemia in males. As for KO females, this mechanism could also be a possibility. Furthermore, based on the significant decrease in hepatic GS content, we hypothesized that females *Lrpprc* KO might have a less efficient glycogenolysis. However, given that there was no significant difference in blood glucose levels compared to their controls and that females naturally have a better glucose homeostasis and insulin sensitivity (reviewed in [55]), perhaps they would have a protective mechanism to avoid severe, and potentially fatal, hypoglycemia.

With that being said, any disruption of liver metabolism, structural integrity, or intracellular dynamics may impair the hepatic ability to stabilize normal glucose homeostasis, and hypoglycemia may eventuate. Other plausible mechanisms would involve i) hyperglucagonemia which might induce downregulation of hepatic glucagon receptor or blunt the hepatic counter-regulatory response to hypoglycemic events [56], and/or ii) increased oxidative stress, an important determinant of hypoglycemia [57, 58, 59]. None of these mechanisms have yet been investigated, and pursuing these avenues of research would help to clarify the link between NAFLD in a lean population and hypoglycemia.

9.3. Hepatic loss of LRPPRC induces sex-dependent extra-hepatic manifestations

Clear sexual dimorphism exists in cardiometabolic health susceptibility. However, data on the mechanisms underlying the progression of cardiovascular events in the lean population exhibiting NAFLD are limited, and even more so when trying to understand the impact of sex. Our study showed that hepatic loss of LRPPRC led to sex-dependent cardiac alterations that affected both mitochondrial/metabolic phenotype, and contractile function. While females presented greater cardiometabolic impairments than males, the latter showed impaired diastolic function.

Our results suggested that only male *Lrpprc* KO mice displayed mild diastolic dysfunction due to increased filling pressure, with the amplitude of the QRS complex tending to increase. This mild diastolic dysfunction could be associated with mitochondrial dysfunction. In fact, across all targeted mitochondrial genes in males, only the fission marker, *Drp1*, and the fusion marker, *Opa1*, were decreased. Interestingly, using

cardiac *Drp1* knockout mice and the cardiac *Mfn* double-knockout mice, Song et al. showed that inhibition of mitochondrial fission, but not fusion, occurred in adult hearts with increased myocardial fibrosis [60]. Moreover, in explanted failing human heart samples and in a rat heart failure model, *Opa1* protein level was significantly reduced, even though MFN1/2 gene and protein levels remained unchanged [61]. Our results would therefore be consistent with these data, especially since, at the molecular level, we had observed a trend towards an increase in cardiac fibrotic markers. It should be noted that males displayed a tendency towards increased QRS complex amplitude, which could be associated with a conductance defects and in cases of advanced pathology, to myocardial scarring resulting from accumulation of fibrotic tissue following cardiac trauma [62]. However, no histopathological signs associated with the presence of fibrosis were observed, which does not exclude the fact that this could be the case if the mice had been followed longer than 14 weeks. In conjunction with mitochondrial dysfunction, remodeling of the circulating and cardiac lipid profile is known to have an impact on the development of cardiac fibrosis [63]. Hence, as described above, remodeling of the circulating lipidome and the increased presence of LDL-C, to the detriment of HDL-C levels, would also be involved in the intracardiac accumulation of deleterious TGs ($\leq 58C$; [64]), and altogether to the development of heart muscle dysfunction.

Conversely, and despite cardiometabolic impairments, our results in females *Lrp1* KO mice showed no evidence of contractile dysfunction. In fact, they exhibited greater cardiac lipidome remodeling than males with, among other species, greater intracardiac accumulation of deleterious TGs ($\leq 58C$). This would be the result of an imbalanced lipid metabolism caused by i) a decrease in reverse cholesterol transport mediated by HDL-C, herein decreased, and ii) a decrease in fatty acid oxidation due to an impairment of β -oxidation. In addition, they exhibited impaired mitochondrial biogenesis and fusion, as fission was not affected. Consistently, we observed a decrease in CLs – although sex-independent – which is known to affect fission/fusion processes, and reduce respiratory performance [65]. Since these results are risk factors for cardiovascular damages, this lack of functional impairments at 14 weeks could be explained by the difference in sex steroid hormones. In fact, it has been shown that cardio-specific *Ampk α 2* deficiency induces, only in males, left ventricular systolic dysfunction, cardiac fibrosis, and cardiac cardiolipin remodeling [66]. In ovariectomized females, presence of cardiac fibrosis and mild cardiolipin remodeling were observed, but no cardiac dysfunction was found, suggesting the possibility that males do not benefit from female hormones protection and/or that male hormones may have some deleterious action. In addition, sex hormone deprivation in both male and female rats provided evidence that i) sex hormones have a cardioprotective role especially

female ones, and ii) by having ovariectomy, females showed first signs of cardiac dysfunction at 12 weeks [67]. We can therefore speculate that even with estrogen deficiency – a hypothesis that we cannot rule out given the impact of estrogen deficiency on mitochondrial dynamics and fatty acid metabolism [68] – *Lrpprc* KO females might develop cardiac dysfunction with or without fibrosis later in life. Besides, it is important to mention that alteration of mitochondrial biogenesis, dynamics, and fatty acid metabolism suggest an impairment of mitochondrial integrity in females, a profile that would most likely be exacerbated in the presence of endogenous stress, and might as well trigger a functional phenotype.

9.4. Conclusion

Using a mouse model that has been previously characterized by its mitochondrial hepatopathy in the absence of obesity, and recapitulating to some extent the circulating lipidomic signature described in NAFLD, we unveiled a sex-dependent multifaceted phenotypic remodeling that goes beyond liver damage. Males, slightly more than females, exhibited fasting hypoglycemia and increased insulin sensitivity reflecting altered glucose metabolism potentially caused by dyshomeostasis in the liver-peripheral organ axis. They also exhibited mild diastolic dysfunction supported by the presence of mild cardiac mitochondrial dysfunction, remodeling of the circulating lipoprotein profile, and to some extent cardiac lipidome. Overall, these results point to a profile that is typically atherogenic and increases the risk of cardiovascular complications. Interestingly enough, females did not manifest cardiac dysfunction, but still exhibited cardiometabolic impairment. These evidence were supported by impaired mitochondrial integrity and β -oxidation, but also by a decreased circulating lipoprotein profile which all together, led to intracardiac accumulation of deleterious triglycerides. However, sex hormones could only delay the onset of functional complications. Collectively, these results indicate that metabolic defects in the liver can result in significant sex-dependent abnormalities that affect both the mitochondrial/metabolic phenotype and contractile function independent of obesity. This experimental model may prove useful to better understand the mechanisms underlying the sex-related variability in the progression of NAFLD in lean people.

9.5. Limitations

This study has limitations. To begin with, we were not at this stage able to explain the mechanisms underlying the discrepancies in term of cardiac phenotype between male and female mice. However, we speculate that estrogen would serve as a counterbalance and that there would be a fine line between the “basal” state described

in this study, and a state inducted by endogenous stress. Further investigations are needed to assess the impact of estrogen by ovariectomy and/or 17 β -estradiol supplementation, and evaluate the impact of endogenous stress (e.g. transverse aortic constriction (TAC) procedure, high-fat diet). Moreover, it is well known that measuring total food intake per day does not eliminate the variability induced by food intake on metabolic parameters and gene expression. We are aware that some measurements were made while mice were in a stimulated (fed) state (e.g. lipoproteins profile and hepatic and cardiac genes), and therefore not in a homeostasis steady state. However, these experiments were unplanned, exploratory, and performed with the equipment available to us at the time of this study. All our samples were collected by trying to adjust as much as possible the time variable between each group. Therefore, and considering the results presented in this study, these measurements should be repeated in a steady (fasted) state. Of note, it cannot be ruled out that growth delay plays a role in this phenotype. Besides, since metabolism is not necessarily associated with it and vice versa, it would be interesting to look at growth hormones and to what extent LRPPRC plays a direct role in delayed growth. Finally, because our model presents an evolutionary disease that follows different trajectories in males and females, a longitudinal study would also be required in the future.

10. Funding

This work was supported by the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) grant 181992, the Montreal Heart Institute Foundation, the Heart and Stroke Foundation of Canada (HSFC) grant G-20-0028685, the Cardiometabolic Health, Diabetes and Obesity Research Network, the NSERC CREATE MATRIX Training Program.

11. Acknowledgements

The authors thank the animal facility for animal care and breeding as well as Dre. Christine Des Rosiers for thoughtful discussions. We also thank Palidwor G., and Ottawa Bioinformatics Core Facility (OBCF) for the generated RNA-sequencing data.

12. Conflict of interest statement

The authors declare no competing interests.

13. Authors contribution

- Study proposal : Deschênes S, Ruiz M;
- Availability of the mouse model : Cuillerier A, Burelle Y, Ruiz M;

- Experimental designs and execution of experiments : Burelle C, Deschênes S, Cuillerier A, De Loof M, Daneault C, Boel H, Chouinard B, Higgins ME, Clavet ME, Tessier N, Martel C, Sirois MG, Ruiz M;
- Analysis of results and statistical analysis : Burelle C, Deschênes S, Daneault C, Boel H, Cuillerier A, Martel C, Ruiz M;
- Writing of the original version of the manuscript : Burelle C, Ruiz M;
- Manuscript revision : Deschênes S, Martel C, Sirois MG, Burelle Y, Ruiz M.

14. Supplementary data

Gene	Primer (sense)	Primer (anti-sense)
Hepatic and cardiac remodeling		
<i>Col1a1</i>	CTGCTGGTCCTGCTGGTC	CCTTGTTGCGCCTGTCTCAC
<i>Col3a1</i>	CCACAAGGATTACAAGGCATAC	AGGAGCACCGACTTCACC
<i>Tgfb1</i>	GAGAAGAAGTCTGTGTGC	GGTTGTGTTGGTTGTAGAGG
<i>Mmp2</i>	ACACTGGGACCTGTCACTCC	GGGTATCCTCGTCCAGAGT
<i>Ccl2</i>	CCCAATGAGTAGGCTGGAGA	TCTGGACCCATTCTTCTTG
<i>Ddit3 (Chop)</i>	GGAAACGAAGAGGAAGATC	ATAGAACTCTGACTGGAA
<i>Hspa5 (Grp78)</i>	TGCAGCAGGACATCAAGTTC	TTTCTTCTGGGGCAAATGTC
Mitochondrial biogenesis and dynamics genes		
<i>Tfam</i>	GCTGATGGGTATGGAGAAG	GAGCCGAATCATCCTTTGC
<i>Mff</i>	TCCCTTTAAACCTCTGGCACT	CGTTTCTGACCAACTGTCCA
<i>Dnm1l (Drp1)</i>	TGATGGGAAGGGTTATTCCA	TTGGCCAGAGATGGGTACTT
<i>Mfn1</i>	GACCGAAGGTCAGATGAAA	AGAGGGCACATTTGCTTTG
<i>Mfn2</i>	TCCCTCGACAGTGTCTTCTCC	CAGGTGTCAGAGGGAGAGGA
<i>Opa1</i>	GGAAGAATCGGACCCAAGAG	GGTTCTTCCGACTGTGGTA
Fatty acid metabolism genes		
<i>Ppara</i>	CAACATGAACAAGGTCAAGGC	GGCAGCAGTGAAGAATCG
<i>Cd36</i>	AGAGGTCTTACACATACAG	CTACAGCCAGATTCAGAAC
<i>Cpt1b</i>	ACCAGTCTTAGCCTCTACG	TGTAGCCCAGGTGAAAGG
<i>Cpt2</i>	TGCTCCGAGGCGTTTGTGAGGG	GAGACATTGCAGCCTATCCAGT
<i>Mcad</i>	TTGACGGAACAGCAGAAA	CCATACGCCAACTCTTCG
<i>Lcad</i>	ATGCCCTATATTGCGAATTACG	CCTTGCTTCCATTGAGAATCC
<i>Vlcad</i>	GGCTCTCCAAGGCTGTATG	ACCACTGCGACTTAACTCTG
Housekeeping genes		
<i>Tbp</i>	AAAGACCATTGCACTTCGTG	GCTCCTGTGCACACCATTTT
<i>Ywhaz</i>	AGACGGAAGGTGCTGAGAAA	GAAGCATTGGGGATCAAGAA
Abbreviations: <i>Col1a1</i> Collagen Type I Alpha 1 Chain; <i>Col3a1</i> , Collagen Type III Alpha 1 Chain; <i>Tgfb1</i> , Transforming Growth Factor Beta 1; <i>Mmp2</i> , Matrix Metalloproteinase 2; <i>Ccl2</i> , C-C Motif Chemokine Ligand 2; <i>Ddit3</i> , DNA Damage Inducible Transcript 3; <i>Hspa5</i> ; Heat Shock Protein Family A (Hsp70) Member 5; <i>Tfam</i> , mitochondrial transcription factor 1; <i>Mff</i> , Mitochondrial Fission Factor; <i>Dnm1l (Drp1)</i> , Dynamin-related protein 1; <i>Mfn1</i> , Mitofusin 1; <i>Mfn2</i> , Mitofusin 2; <i>Opa1</i> , OPA1 Mitochondrial Dynamin Like GTPase; <i>Ppara</i> , peroxisome proliferator-activated receptor alpha; <i>Cd36</i> , CD36 Molecule, <i>Cpt</i> , Carnitine Palmitoyltransferase; <i>Acadm</i> , medium- chain acyl-CoA dehydrogenase; <i>Lcad</i> , long-chain acyl-CoA dehydrogenase; <i>Vlcad</i> , very long-chain acyl-CoA dehydrogenase; <i>Tbp</i> , TATA-Box Binding Protein; <i>Ywhaz</i> , Tyrosine 3-Monooxygenase/Tryptophan 5-Monooxygenase Activation Protein Zeta.		

Table 9.1. List of murine oligonucleotides used for RT-qPCR.

Mass / BW	M-WT M-KO		Adj. p-value	F-WT F-KO		Adj. p-value	Genotype	Sex p-value	Interaction
Liver	50.14	46.10	0.5926	44.41	43.87	0.9888	0.0680	0.0025*	0.1595
Heart	4.009	3.983	0.9942	4.311	4.420	0.7253	0.5803	<0.0001*†	0.3658
WAT	10.33	8.718	0.3609	4.958	5.339	0.9810	0.3844	<0.0001*†	0.1629
BAT	4.928	5.006	0.9979	4.873	4.458	0.7748	0.5852	0.3324	0.4266
Soleus	0.407	0.381	0.6920	0.448	0.445	0.9994	0.4136	0.0047	0.5175
Gastrocnemius	6.216	6.233	>0.9999	6.537	6.268	0.7835	0.5427	0.3916	0.4903

Table 9.2. Organ mass normalized to body weight (BW) in WT and Lrp1rc KO mice. Statistical analyses were performed using an ordinary two-way ANOVA, and data were corrected for multiple comparisons using, as recommended, Tukey's test (with a single pooled variance). Adj p-value: adjusted p- value. Significance was reached for: * Males WT vs Females WT, † Males KO vs Females KO. Related to figure 8.1.

mgi_symbol	ensembl_gene_id	q values [†]	Log2(FC KOF/KOM)
<i>Cyp2c23</i>	ENSMUSG00000025197	0,049	0,911
<i>Gm49431</i>	ENSMUSG00000116130	0,048	1,223
<i>ligp1</i>	ENSMUSG00000054072	0,046	1,034
<i>Arhgap21</i>	ENSMUSG00000036591	0,038	1,343
<i>Smarca2</i>	ENSMUSG00000024921	0,038	0,605
<i>Srd5a1</i>	ENSMUSG00000021594	0,018	1,662
<i>C6</i>	ENSMUSG00000022181	0,017	2,358
<i>Lifr</i>	ENSMUSG00000054263	0,007	1,226

[†]Multiple unpaired t-tests were performed using an FDR < 0.05 with the two-stage step-up method of Benjamini, Krieger and Yekutieli.

Table 9.3. Transcripts significantly up- and down-regulated based of Log2(fold-change) in females KO vs. males KO. Related to figure 8.3.

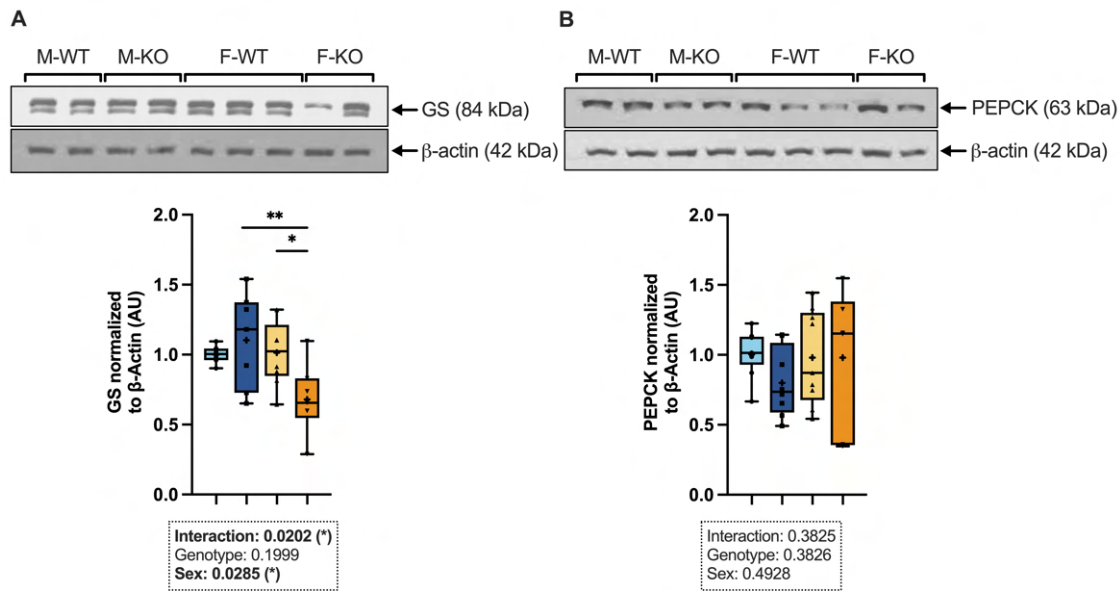
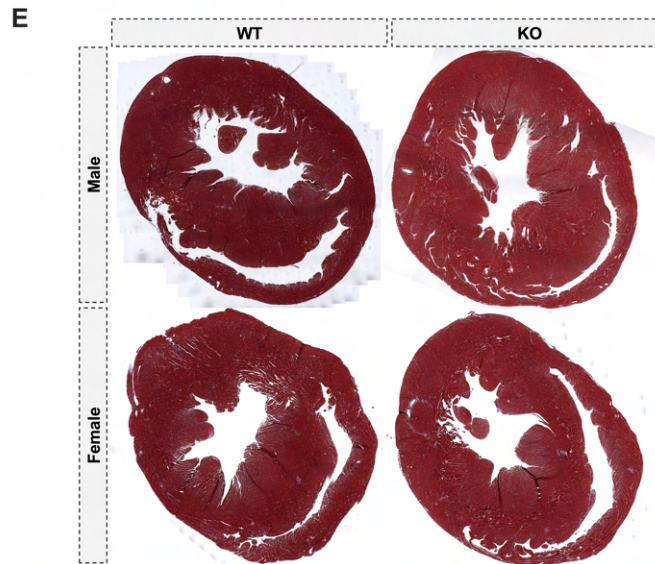
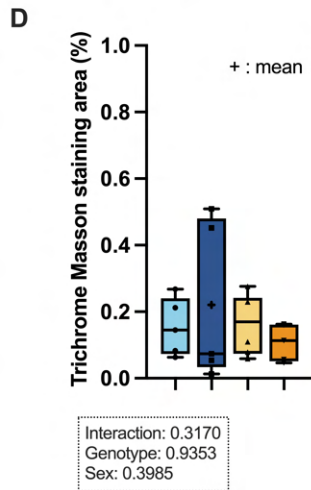
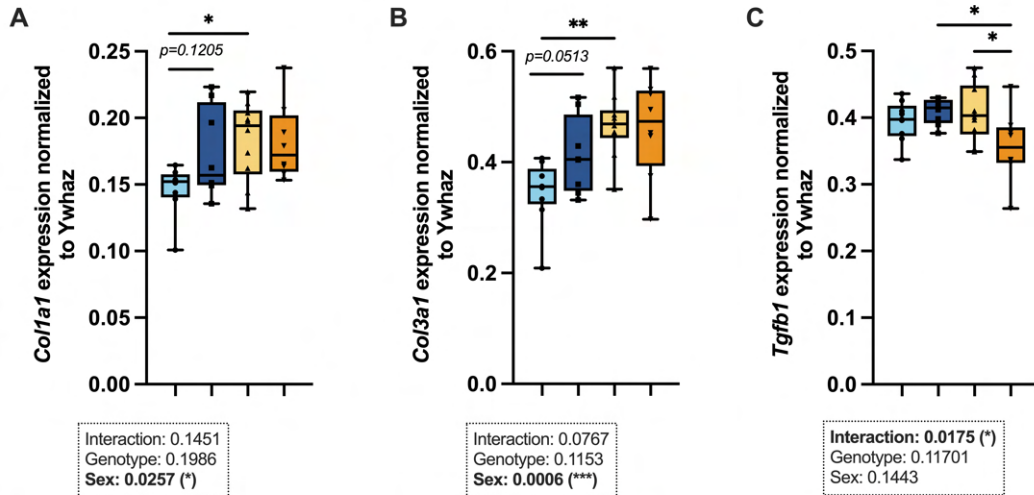
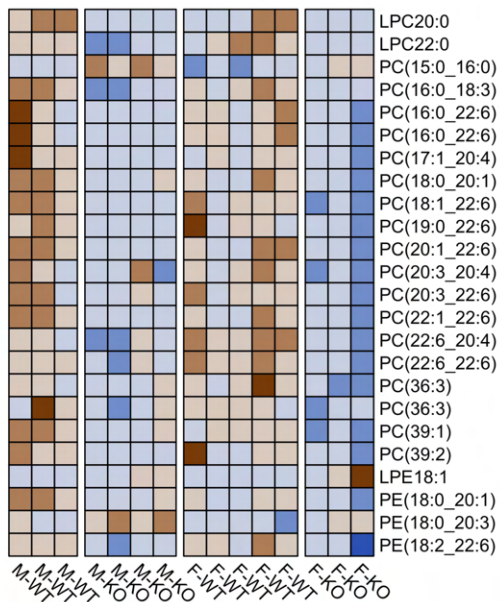


Fig. 14.1. Immunoblot analysis of Glycogen Synthase and PEPCK content in the liver of WT and *Lrp1rc* KO mice. Representative images and quantification (box plots; n=10) of **(A)** Glycogen Synthase (GS), and **(B)** PEPCK. Actin was used as loading control. Difference between WT and KO mice was assessed with a two-way ANOVA following by Šidák multiple comparison post hoc analysis: * $p < 0.05$, ** $p < 0.002$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. + : mean for each group.



F Glycerophospholipids



G Ether lipids

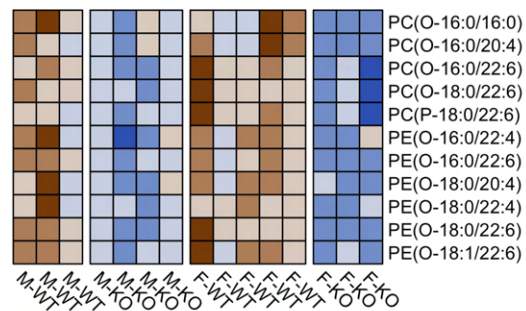


Fig. 14.2. Fibrotic and lipidomic phenotype in the heart of WT and *Lrpprc* KO mice. Several cardiac markers were quantified by RT-qPCR (n=9-10): **(A)** *Col1a1* and **(B)** *Col3a1* for fibrosis, and **(C)** *Tgf β 1* for inflammation. **(D)** Trichrome Masson staining area (in %) was quantified in hearts of *Lrpprc* WT and KO mice (n=8), and **(E)** representative images were taking. Heatmaps selected lipids significantly ($p\text{-corr} < 0.1$) discriminating KO from controls mice, and identified by MS/MS using LC-QTOF. Each dot represents a log₂-transformed KO/WT signal intensity ratio (n=7-8) for the indicated lipid (sub)classes with their acyl side chain(s) - **(F)** glycerophospholipids, and **(G)** ether lipids. The underscore symbol “_” beside the acyl side chain for PCs, PEs, and TGs refers to acyl chains for which the sn position remains to be ascertained. Difference between WT and KO mice was assessed with a paired Student's t test: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ before and $p\text{-corr} < 0.1$ after Benjamini-Hochberg correction. Covariance analyses were performed to test the impact of sex, and are represented by colored squares under each lipid. Related to figures 8.5 and 8.8.

References

- [1] 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*. 2016-07;64(1):73-84. Place: United States.
- [2] Ye Q, Zou B, Yeo YH, Li J, Huang DQ, Wu Y, et al. Global prevalence, incidence, and outcomes of non-obese or lean non-alcoholic fatty liver disease: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Gastroenterol Hepatol*. 2020-08;5(8):739-52. Place: Netherlands.
- [3] Kuchay MS, Martínez-Montoro JI, Choudhary NS, Fernández-García JC, Ramos-Molina B. Non-Alcoholic Fatty Liver Disease in Lean and Non-Obese Individuals: Current and Future Challenges. *Biomedicines*. 2021-09-28;9(10).
- [4] Xu R, Pan J, Zhou W, Ji G, Dang Y. Recent advances in lean NAFLD. *Biomed Pharmacother*. 2022-09;153:113331. Place: France.
- [5] Galiero R, Caturano A, Vetrano E, Cesaro A, Rinaldi L, Salvatore T, et al. Pathophysiological mechanisms and clinical evidence of relationship between Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) and cardiovascular disease. *Rev Cardiovasc Med*. 2021-09-24;22(3):755-68. Place: Singapore.
- [6] Jung UJ, Choi MS. Obesity and its metabolic complications: the role of adipokines and the relationship between obesity, inflammation, insulin resistance, dyslipidemia and nonalcoholic fatty liver disease. *Int J Mol Sci*. 2014-04-11;15(4):6184-223.
- [7] Lovric A, Granér M, Bjornson E, Arif M, Benfeitas R, Nyman K, et al. Characterization of different fat depots in NAFLD using inflammation-associated proteome, lipidome and metabolome. *Sci Rep*. 2018-09-21;8(1):14200.
- [8] Stefano GB, Challenger S, Kream RM. Hyperglycemia-associated alterations in cellular signaling and dysregulated mitochondrial bioenergetics in human metabolic disorders. *Eur J Nutr*. 2016-12;55(8):2339-45.
- [9] Legaki AI, Moustakas II, Sikorska M, Papadopoulos G, Velliou RI, Chatzigeorgiou A. Hepatocyte Mitochondrial Dynamics and Bioenergetics in Obesity-Related Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Curr Obes Rep*. 2022-09;11(3):126-43.

- [10] Sasarman F, Brunel-Guitton C, Antonicka H, Wai T, Shoubridge EA. LRPPRC and SLIRP interact in a ribonucleoprotein complex that regulates posttranscriptional gene expression in mitochondria. *Mol Biol Cell*. 2010-04-15;21(8):1315-23.
- [11] Cuillerier A, Honarmand S, Cadete VJJ, Ruiz M, Forest A, Deschênes S, et al. Loss of hepatic LRPPRC alters mitochondrial bioenergetics, regulation of permeability transition and trans-membrane ROS diffusion. *Hum Mol Genet*. 2017-08-15;26(16):3186-201.
- [12] Sasarman F, Nishimura T, Antonicka H, Weraarpachai W, Shoubridge EA. Tissue-specific responses to the LRPPRC founder mutation in French Canadian Leigh Syndrome. *Hum Mol Genet*. 2015-01-15;24(2):480-91.
- [13] Ruiz M, Cuillerier A, Daneault C, Deschênes S, Frayne IR, Bouchard B, et al. Lipidomics unveils lipid dyshomeostasis and low circulating plasmalogens as biomarkers in a monogenic mitochondrial disorder. *JCI Insight*. 2019-07-25;4(14):123231.
- [14] Lefebvre P, Staels B. Hepatic sexual dimorphism - implications for non-alcoholic fatty liver disease. *Nat Rev Endocrinol*. 2021-11;17(11):662-70. Place: England.
- [15] Dupuis J, Sirois MG, Rhéaume E, Nguyen QT, Clavet-Lanthier ME, Brand G, et al. Colchicine reduces lung injury in experimental acute respiratory distress syndrome. *PLoS One*. 2020;15(12):e0242318.
- [16] Ruiz M, Khairallah M, Dingar D, Vaniotis G, Khairallah RJ, Lauzier B, et al. MK2-Deficient Mice Are Bradycardic and Display Delayed Hypertrophic Remodeling in Response to a Chronic Increase in Afterload. *J Am Heart Assoc*. 2021-02-16;10(4):e017791.
- [17] Milasan A, Smaani A, Martel C. Early rescue of lymphatic function limits atherosclerosis progression in *Ldlr(-/-)* mice. *Atherosclerosis*. 2019-04;283:106-19. Place: Ireland.
- [18] Ruiz M, Coderre L, Lachance D, Houde V, Martel C, Thompson Legault J, et al. MK2 Deletion in Mice Prevents Diabetes-Induced Perturbations in Lipid Metabolism and Cardiac Dysfunction. *Diabetes*. 2016-02;65(2):381-92. Place: United States.
- [19] Forest A, Ruiz M, Bouchard B, Boucher G, Gingras O, Daneault C, et al. Comprehensive and Reproducible Untargeted Lipidomic Workflow Using LC-QTOF Validated for Human Plasma Analysis. *J Proteome Res*. 2018-11-02;17(11):3657-70.
- [20] Bindea G, Mlecnik B, Hackl H, Charoentong P, Tosolini M, Kirilovsky A, et al. ClueGO: a Cytoscape plug-in to decipher functionally grouped gene ontology and pathway annotation networks. *Bioinformatics*. 2009-04-15;25(8):1091-3.
- [21] Katz TA, Grimm SL, Kaushal A, Dong J, Treviño LS, Jangid RK, et al. Hepatic Tumor Formation in Adult Mice Developmentally Exposed to Organotin. *Environ Health Perspect*. 2020-01;128(1):17010.
- [22] Morin C, Mitchell G, Larochelle J, Lambert M, Ogier H, Robinson BH, et al. Clinical, metabolic, and genetic aspects of cytochrome C oxidase deficiency in Saguenay-Lac-Saint-Jean.;53(2):488-96.
- [23] Han VX, Tan TS, Wang FS, Tay SKH. Novel LRPPRC Mutation in a Boy With Mild Leigh Syndrome, French-Canadian Type Outside of Québec;4:2329048X17737638.
- [24] Piro E, Serra G, Antona V, Giuffrè M, Giorgio E, Sirchia F, et al. Novel LRPPRC compound heterozygous mutation in a child with early-onset Leigh syndrome French-Canadian type: case report of an Italian patient;46(1):140.
- [25] Kasza I, Adler D, Nelson DW, Eric Yen CL, Dumas S, Ntambi JM, et al. Evaporative cooling provides a major metabolic energy sink. *Mol Metab*. 2019-09;27:47-61.
- [26] Ji C, Kaplowitz N, Lau MY, Kao E, Petrovic LM, Lee AS. Liver-specific loss of glucose-regulated protein 78 perturbs the unfolded protein response and exacerbates a spectrum of liver diseases in mice. *Hepatology*. 2011-07;54(1):229-39.

- [27] Tsai MH, Peng YS, Chen YC, Liu NJ, Ho YP, Fang JT, et al. Adrenal insufficiency in patients with cirrhosis, severe sepsis and septic shock. *Hepatology*. 2006-04;43(4):673-81. Place: United States.
- [28] Lauer SJ, Walker D, Elshourbagy NA, Reardon CA, Levy-Wilson B, Taylor JM. Two copies of the human apolipoprotein C-I gene are linked closely to the apolipoprotein E gene;263(15):7277-86.
- [29] Westerterp M, Van Eck M, de Haan W, Offerman EH, Van Berkel TJC, Havekes LM, et al. Apolipoprotein CI aggravates atherosclerosis development in ApoE-knockout mice despite mediating cholesterol efflux from macrophages;195(1):e9-e16.
- [30] Wassef H, Salem H, Bissonnette S, Baass A, Dufour R, Davignon J, et al. White Adipose Tissue Apolipoprotein C-I Secretion in Relation to Delayed Plasma Clearance of Dietary Fat in Humans;32(11):2785-93.
- [31] Feingold KR. Introduction to Lipids and Lipoproteins. In: Feingold KR, Anawalt B, Boyce A, Chrousos G, de Herder WW, Dhatariya K, et al., editors. *Endotext*. MDText.com, Inc.; 2000. .
- [32] Ma ZG, Yuan YP, Wu HM, Zhang X, Tang QZ. Cardiac fibrosis: new insights into the pathogenesis. *Int J Biol Sci*. 2018;14(12):1645-57.
- [33] Oláhová M, Hardy SA, Hall J, Yarham JW, Haack TB, Wilson WC, et al. LRPPRC mutations cause early-onset multisystem mitochondrial disease outside of the French-Canadian population. *Brain*;138:3503-19.
- [34] Holt HB, Wild SH, Postle AD, Zhang J, Koster G, Umpleby M, et al. Cortisol clearance and associations with insulin sensitivity, body fat and fatty liver in middle-aged men. *Diabetologia*. 2007-05;50(5):1024-32.
- [35] Kim SY. Diagnosis and Treatment of Hypopituitarism. *Endocrinol Metab (Seoul)*. 2015-12;30(4):443-55.
- [36] Alharbi H, Priestley JRC, Wilkins BJ, Ganetzky RD. Mitochondrial Hepatopathies. *Clin Liver Dis (Hoboken)*. 2021-11;18(5):243-50.
- [37] Liu B, Xiang L, Ji J, Liu W, Chen Y, Xia M, et al. Sparcl1 promotes nonalcoholic steatohepatitis progression in mice through upregulation of CCL2. *J Clin Invest*. 2021-10-15;131(20).
- [38] Geervliet E, Bansal R. Matrix Metalloproteinases as Potential Biomarkers and Therapeutic Targets in Liver Diseases. *Cells*. 2020-05-13;9(5).
- [39] Kostrzewski T, Snow S, Battle AL, Peel S, Ahmad Z, Basak J, et al. Modelling human liver fibrosis in the context of non-alcoholic steatohepatitis using a microphysiological system. *Communications Biology*. 2021-09-15;4(1):1080.
- [40] 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. *Toxicol Sci*. 2014-01;137(1):26-35.
- [41] Ahmed A, Rabbitt E, Brady T, Brown C, Guest P, Bujalska IJ, et al. A switch in hepatic cortisol metabolism across the spectrum of non alcoholic fatty liver disease. *PLoS One*. 2012;7(2):e29531.
- [42] Schiffrin M, Winkler C, Quignodon L, Naldi A, Trötzmüller M, Köfeler H, et al. Sex Dimorphism of Nonalcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) in Pparg-Null Mice. *Int J Mol Sci*. 2021-09-15;22(18).
- [43] Kurt Z, Barrere-Cain R, LaGuardia J, Mehrabian M, Pan C, Hui ST, et al. Tissue-specific pathways and networks underlying sexual dimorphism in non-alcoholic fatty liver disease. *Biol Sex Differ*. 2018-10-22;9(1):46.
- [44] Feng RN, Du SS, Wang C, Li YC, Liu LY, Guo FC, et al. Lean-non-alcoholic fatty liver disease increases risk for metabolic disorders in a normal weight Chinese population. *World J Gastroenterol*. 2014-12-21;20(47):17932-40.

- [45] Tutunchi H, Naeini F, Ebrahimi-Mameghani M, Mobasser M, Naghshi S, Ostadrahimi A. The association of the steatosis severity, NAFLD fibrosis score and FIB-4 index with atherogenic dyslipidaemia in adult patients with NAFLD: A cross-sectional study. *Int J Clin Pract*. 2021-06;75(6):e14131. Place: India.
- [46] Fujita K, Nozaki Y, Wada K, Yoneda M, Fujimoto Y, Fujitake M, et al. Dysfunctional very-low-density lipoprotein synthesis and release is a key factor in nonalcoholic steatohepatitis pathogenesis. *Hepatology*. 2009-09;50(3):772-80. Place: United States.
- [47] Younes R, Bugianesi E. NASH in Lean Individuals. *Semin Liver Dis*. 2019-02;39(1):86-95. Place: United States.
- [48] Rinella ME, Green RM. The methionine-choline deficient dietary model of steatohepatitis does not exhibit insulin resistance. *J Hepatol*. 2004-01;40(1):47-51. Place: Netherlands.
- [49] Melchior JC. Syndrome de renutrition. In: *Traité de nutrition artificielle de l'adulte*. Springer Paris; 2007. p. 665-74.
- [50] Lambillotte C, Gilon P, Henquin JC. Direct glucocorticoid inhibition of insulin secretion. An in vitro study of dexamethasone effects in mouse islets. *J Clin Invest*. 1997-02-01;99(3):414-23.
- [51] Gjorgjieva M, Mithieux G, Rajas F. Hepatic stress associated with pathologies characterized by disturbed glucose production. *Cell Stress*. 2019-01-28;3(3):86-99.
- [52] Kido K, Egawa T, Watanabe S, Kawanaka K, Treebak JT, Hayashi T. Fasting potentiates insulin-mediated glucose uptake in rested and prior-contracted rat skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2022-05-01;322(5):E425-35. Place: United States.
- [53] Flatt PR, Bailey CJ. Dietary components and plasma insulin responses to fasting and refeeding in genetically obese hyperglycaemic (ob/ob) mice. *Br J Nutr*. 1984-05;51(3):403-13. Place: England.
- [54] Morton NM, Holmes MC, Fiévet C, Staels B, Tailleux A, Mullins JJ, et al. Improved lipid and lipoprotein profile, hepatic insulin sensitivity, and glucose tolerance in 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 null mice. *J Biol Chem*. 2001-11-02;276(44):41293-300. Place: United States.
- [55] Varlamov O, Bethea CL, Roberts CT]. Sex-specific differences in lipid and glucose metabolism. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2014;5:241.
- [56] Wewer Albrechtsen NJ, Kuhre RE, Pedersen J, Knop FK, Holst JJ. The biology of glucagon and the consequences of hyperglucagonemia. *Biomark Med*. 2016-11;10(11):1141-51. Place: England.
- [57] Hashiba M, Ono M, Hyogo H, Ikeda Y, Masuda K, Yoshioka R, et al. Glycemic variability is an independent predictive factor for development of hepatic fibrosis in nonalcoholic fatty liver disease. *PLoS One*. 2013;8(11):e76161.
- [58] Ochi T, Kawaguchi T, Nakahara T, Ono M, Noguchi S, Koshiyama Y, et al. Differences in characteristics of glucose intolerance between patients with NAFLD and chronic hepatitis C as determined by CGMS. *Sci Rep*. 2017-08-31;7(1):10146.
- [59] Hirsch IB. Glycemic Variability and Diabetes Complications: Does It Matter? Of Course It Does! *Diabetes Care*. 2015-08;38(8):1610-4. Place: United States.
- [60] Song M, Mihara K, Chen Y, Scorrano L, Dorn GWn. Mitochondrial fission and fusion factors reciprocally orchestrate mitophagic culling in mouse hearts and cultured fibroblasts. *Cell Metab*. 2015-02-03;21(2):273-86.
- [61] Chen KH, Guo X, Ma D, Guo Y, Li Q, Yang D, et al. Dysregulation of HSG triggers vascular proliferative disorders. *Nat Cell Biol*. 2004-09;6(9):872-83. Place: England.
- [62] Take Y, Morita H. Fragmented QRS: What Is The Meaning? *Indian Pacing Electrophysiol J*. 2012-09;12(5):213-25.

- [63] Marín-Royo G, Ortega-Hernández A, Martínez-Martínez E, Jurado-López R, Luaces M, Islas F, et al. The Impact of Cardiac Lipotoxicity on Cardiac Function and Mirnas Signature in Obese and Non-Obese Rats with Myocardial Infarction. *Scientific Reports*. 2019-01-24;9(1):444.
- [64] Rhee EP, Cheng S, Larson MG, Walford GA, Lewis GD, McCabe E, et al. Lipid profiling identifies a triacylglycerol signature of insulin resistance and improves diabetes prediction in humans. *J Clin Invest*. 2011-04;121(4):1402-11.
- [65] Dudek J. Role of Cardiolipin in Mitochondrial Signaling Pathways. *Front Cell Dev Biol*. 2017;5:90.
- [66] Grimbert L, Sanz MN, Gressette M, Rucker-Martin C, Novotova M, Solgadi A, et al. Spatiotemporal AMPK α 2 deletion in mice induces cardiac dysfunction, fibrosis and cardiolipin remodeling associated with mitochondrial dysfunction in males only. *Biol Sex Differ*. 2021-09-17;12(1):52.
- [67] Shinlapawittayatorn K, Pongkan W, Sivasinprasasn S, Chattipakorn SC, Chattipakorn N. Sexual dimorphism in cardiometabolic and cardiac mitochondrial function in obese rats following sex hormone deprivation. *Nutr Diabetes*. 2022-03-17;12(1):11.
- [68] Fan W, Evans R. PPARs and ERRs: molecular mediators of mitochondrial metabolism. *Curr Opin Cell Biol*. 2015-04;33:49-54.

Discussion et conclusion

En prenant avantage d'un nouveau modèle murin exhibant une déficience hépatique pour le gène *Lrpprc*, le travail de ce mémoire a permis de donner un nouvel aperçu de l'implication cruciale des mitochondries dans la physiopathologie de la NAFLD sans obésité et de son impact métabolique et cardiaque.

Ce modèle de souris présentant une inactivation hépato-spécifique du gène *Lrpprc* avait préalablement été caractérisé par son hépatopathie mitochondriale en absence d'obésité, récapitulant dans une certaine mesure les changements décrits dans la NAFLD. Au niveau moléculaire, la déficience en LRPPRC entraîne un grave défaut d'assemblage du complexe IV et ne se limite pas à l'atteinte de l'OXPPOS, elle comprend également une atteinte de l'oxydation des acides gras à longue chaîne et la présence d'un stress oxydatif mitochondrial [191]. Au niveau circulant, cette atteinte conduit à la présence d'une signature lipidomique et circulante caractéristique de la NAFLD avec notamment une augmentation des niveaux hépatiques de TGs et une augmentation des niveaux plasmatiques des LCACs [193].

Compte tenu du manque crucial de données sur les mécanismes physiopathologiques de la NAFLD sans obésité et ces manifestations extra-hépatiques, et notamment cardiovasculaires, profiter de l'hépato-spécificité de ce modèle nous a permis de mieux définir l'implication spécifique des mitochondries hépatiques dans la progression de cette pathologie. En considérant le sexe dans le développement et la progression de la maladie hépatique, cette étude a également servi à réitérer le besoin de distinguer les sexes. Au niveau hépatique, la perte hépatique de LRPPRC a induit un remodelage matriciel délétère avec des signes de fibrose et d'inflammation similaires chez les deux sexes. Cette similarité entre les sexes s'est cependant dissipée lorsque certains paramètres des profils circulant et cardiaque ont été évalués. En effet, les mâles, un peu plus que les femelles, présentaient une hypoglycémie à jeun et une sensibilité accrue à l'insuline. Ces derniers présentaient une légère dysfonction diastolique soutenue par un remodelage des lipoprotéines circulantes et, dans une certaine mesure, un remodelage du lipidome cardiaque. À l'inverse, les femelles ne manifestaient aucun dysfonctionnement cardiaque, mais présentaient

des atteintes cardiométaboliques soutenues par une intégrité mitochondriale et une β -oxydation altérée, un remodelage des lipoprotéines circulantes et une accumulation intracardiaque de triglycérides délétères.

Étant donné que ces points ont préalablement été discutés dans le chapitre 2, nous allons, dans ce troisième et dernier chapitre, reprendre des éléments clés de la discussion afin d'en pousser plus loin l'analyse des mécanismes et la proposition de nouvelles pistes d'investigation.

15. Métabolisme lipidique et lipoprotéines

15.1. Métabolisme du cholestérol

Le maintien de l'homéostasie du cholestérol dans l'organisme est obtenu en équilibrant les voies d'entrée et de sortie du métabolisme du cholestérol. Ceci comprend l'absorption par les entérocytes du cholestérol non estérifié provenant de l'alimentation ainsi que sa synthèse *de novo* principalement retrouvée et stockée dans les hépatocytes [194]. Quant aux principales voies de sortie, le cholestérol non estérifié peut être converti en acides biliaires et excrété via les voies hépatobiliaire et trans-intestinale [195].

15.1.1. Synthèse hépatique

La nature des modifications de l'homéostasie du cholestérol associées à la NAFLD a fait l'objet de recherches approfondies. Les patients atteints de NAFL/NASH présentent souvent différents degrés de dyslipidémie arborant les principales caractéristiques suivantes: une élévation des taux de cholestérol total, de TGs et de LDL-C et une baisse de la concentration en HDL-C [194]. Chez les patients avec un IMC normal ($IMC < 24 \text{ kg/m}^2$) et atteint d'une NAFLD, Feng RN et al. ont signalés que ces derniers partageaient ce profil lipidique avec les patients NAFLD en surpoids ou souffrant d'obésité [196]. Nos résultats sont cohérents avec ces évidences bien que seuls les mâles H-*Lrp1*^{KO} présentaient une augmentation des taux de LDL-C et une diminution des taux de HDL-C. Chez les femelles H-*Lrp1*^{KO}, celles-ci présentaient un profil différent avec des concentrations de lipoprotéines plasmatiques (VLDL-C et IDL/LDL-C) inférieures à ceux de leurs contrôles, concordant avec les données de transcriptomique. La figure 15.1 résume l'ensemble des transcrits associés au métabolisme du cholestérol qui étaient diminués chez les souris H-*Lrp1*^{KO} mâles et femelles (données brutes non présentées) ainsi que la concentration plasmatique des VLDL-C, IDL/LDL-C et HDL-C obtenues par FPLC.

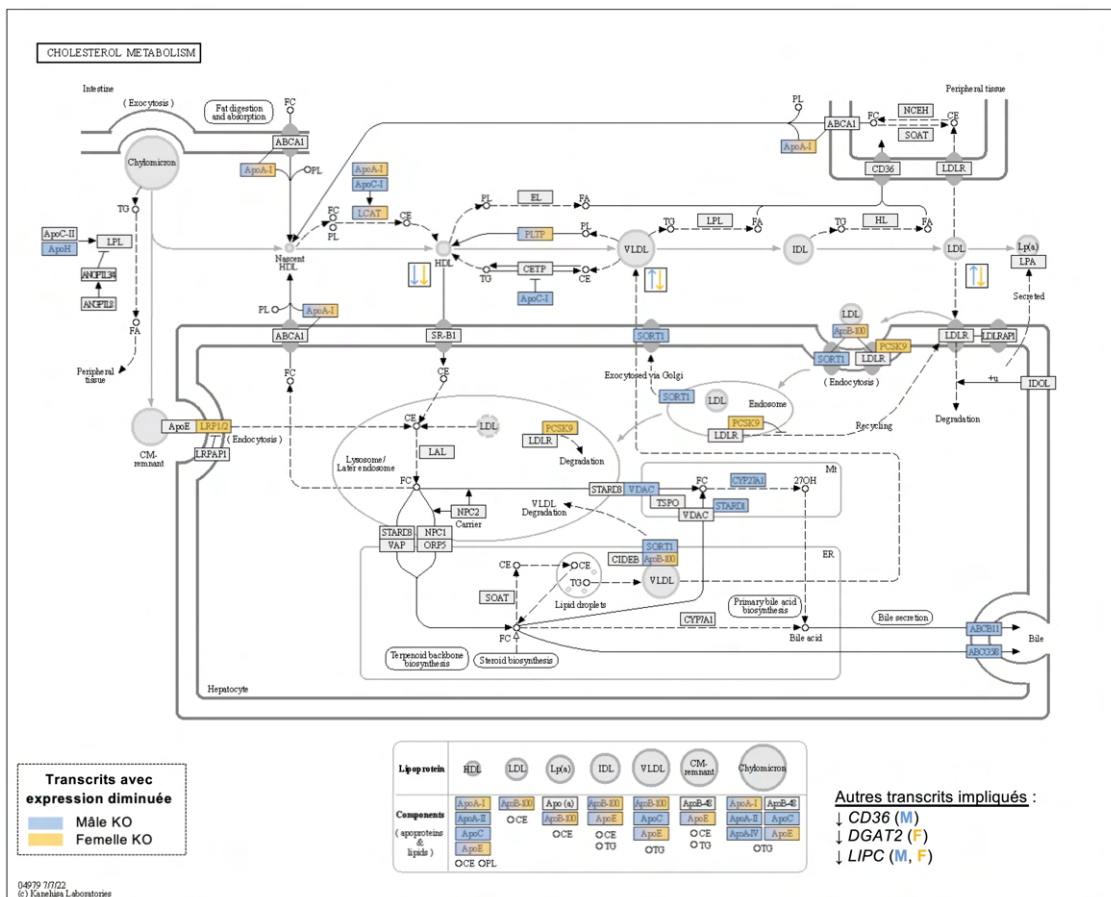


Fig. 15.1. Cartographie des gènes impliqués dans le métabolisme du cholestérol chez *Mus musculus*. Issus de la base de données KEGG BRITE (#04979, Kanehisa Laboratories), les transcripts diminués chez la souris H-*Lrpprc*^{KO} sont colorés en bleu pour les mâles et en jaune pour les femelles. Les flèches suivent le même code de couleur, montrant les concentrations des différentes fractions de lipoprotéines obtenues par FPLC.

Chez les femelles H-*Lrpprc*^{KO}, la diminution des concentrations de l'ensemble des lipoprotéines ainsi que la baisse de l'expression d'une partie des apolipoprotéines (e.g. ApoB, ApoE, ApoA-1) suggèrent qu'elles pourraient présenter un défaut de synthèse des lipoprotéines et principalement des VLDL, phénomène ayant été préalablement observé chez des patients, bien qu'en surpoids, atteints de NASH [197]. Dans cette étude, malgré le fait que les patients atteints de NAFL et de NASH présentaient un influx intrahépatique de TGs très similaire, l'afflux de lipides sous forme de VLDL était plus altéré chez les patients présentant une NASH. Charlton et al. avaient d'ailleurs associé la NASH à une synthèse hépatique de l'apolipoprotéine B-100 (apoB100) nettement altérée par rapport à des témoins obèses (appariés à l'IMC) sans NASH, étape cinétiquement déterminante dans la synthèse des VLDLs [198]. Combinées ensemble, ces études ont permis d'établir que l'entrave de la sécrétion de VLDL-TG, causée entre

autres par la diminution de l'expression hépatique de l'apoB100, et une oxydation réduite des AGs pouvait être des facteurs clés dans la pathogenèse de la NASH. Cependant, dans le cadre de notre étude, aucune analyse n'a encore été faite pour affirmer ou infirmer ces hypothèses chez notre modèle murin. Il serait de ce fait pertinent de cibler par traceurs isotopiques l'influx de TGs et de l'afflux de cholestérol ainsi que de regarder l'expression des apolipoprotéines nécessaires à la synthèse des VLDL (ApoB-48, ApoB-100, ApoC, ApoE). Bien évidemment, aux vues des transcripts diminués chez les femelles H-*Lrpprc*^{KO} (Fig.15.1), nous ne pouvons exclure l'implication de diverses enzymes ou espèces lipidiques impliquées dans la biosynthèse des VLDLs. On peut par exemple évoquer l'implication des PC, dont la biosynthèse active est nécessaire à la sécrétion hépatique des VLDL [199]. En effet, il avait été préalablement montré que les souris H-*Lrpprc*^{KO} présentaient un remodelage du lipidome hépatique avec notamment des variations dans les concentrations en PC et une augmentation du ratio PE/PC. On peut donc imaginer un potentiel lien entre la diminution des taux de PC et la diminution de la sécrétion de VLDL et particulier chez les femelles.

Pour finir, il est intéressant de noter que, chez l'humain, *LRPPRC* se situe sur le chromosome 2 entre les paires de bases 43 886 224 et 43 995 989. Outre les publications faisant l'état de ces variants, une dizaine d'articles ont été publiés sur le polymorphisme nucléotidique (SNP) rs137852988 se situant au niveau de la 43 875 377^e paire de base du gène codant pour *ABCG8*. La protéine codée par ce gène a pour fonction d'empêcher l'entrée des stérols au niveau intestinal et de favoriser l'excrétion du cholestérol et des stérols dans la bile. La présence du SNP rs137852988 contribue alors à l'accumulation de stérols et à l'athérosclérose, et a été observée chez des patients atteints de sitostérolémie (Gene ID: 64241, [200]). Or, chez les mâles H-*Lrpprc*^{KO}, *ABCG8* était significativement diminué, laissant entrevoir la possibilité d'une atteinte des processus de biosynthèse des acides biliaires, processus ressortis lors de l'analyse du transcriptome des souris H-*Lrpprc*^{KO} (données non présentées).

15.1.2. Lipides, lipoprotéines et lipotoxicité cardiaque

Il est largement admis que les AGs sont les substrats utilisés de manière prépondérante par le myocarde adulte. Il fonctionne par ailleurs de manière optimale lorsqu'il oxyde les AGs et le glucose simultanément [201] et cela malgré la présence d'une boucle de rétrocontrôle, communément appelé cycle de Randle, balançant l'utilisation cellulaire de ces deux substrats. Cependant, le réseau métabolique cardiaque étant très flexible, celui-ci utilise d'autres substrats lorsqu'ils deviennent abondamment disponibles (e.g. le lactate durant l'exercice [202, 203], les cétones durant un jeûne prolongé ou un régime cétogène [204] et les acides aminés lorsque la sensation de faim se fait ressentir). L'importance de ces divers substrats soutient le concept

de flexibilité métabolique qui confère l'avantage d'un approvisionnement adéquat en ATP pour une contraction cardiaque continue dans diverses conditions physiologiques.

Brièvement, les AGs sont fournis au coeur sous forme d'AGLs lié à l'albumine ou via l'hydrolyse par la lipoprotéine lipase (LPL) des chylomicrons et VLDL à la surface luminale des cellules endothéliales [205, 206]. La majorité des lipides qui entrent dans les cellules cardiaques, par diffusion passive ou par des transporteurs [207], sont alors détournés vers l'utilisation des AGs, certains étant stockés ou utilisés pour des besoins structurels [208]. Cependant, le décalage entre l'absorption et l'oxydation des acides gras à longue chaîne dans le myocarde induit une lipotoxicité caractérisée par une accumulation de TGs, de diacylglycérols (DAG), de céramides et d'autres lipides (Fig.15.2). Au long terme, cette lipotoxicité myocardique peut entraîner l'apoptose des cardiomyocytes, la fibrose interstitielle et le dysfonctionnement cardiaque [209], corrélation ayant clairement été mise en évidence chez les rongeurs et les humains. Dans le cadre de cette étude, il est de prime abord clair que les manifestations cardiaques proviennent au moins en partie d'une modulation du lipidome circulant. D'un côté, les femelles H-*Lrpplc*^{KO} présentent un remodelage du lipidome cardiaque. En faveur d'une accumulation intracardiaque de TGs délétères, ce remodelage pourrait être le résultat d'un métabolisme lipidique déséquilibré causé par i) une diminution du transport inverse du cholestérol médié par les HDL-C et ii) une diminution de l'oxydation des AGs due à une déficience de la β -oxydation. De l'autre côté, les mâles H-*Lrpplc*^{KO} n'affichent pas, dans les limites de nos expériences, d'atteintes cardiometaboliques majeures, mais présentent un profond remodelage du profil des lipoprotéines plasmatiques avec une légère dysfonction diastolique, profil corrélant avec la littérature quant à l'impact sur la santé cardiovasculaire. En effet, les gènes de la β -oxydation n'étant pas augmentée chez les mâles, nous pouvons supposer qu'un déséquilibre entre une absorption accrue de TGs provenant des VLDL-C et LDL-C et le rythme inchangé de l'oxydation des AGs ait eu *in fine* un impact sur la fibrogenèse et la fonction cardiaque.

Il faut noter cependant qu'en ce qui concerne la fonction de la LPL, l'action de celle-ci sur la clairance des chylomicrons-TG est probablement plus importante que son effet sur l'hydrolyse des VLDL-TG. En effet, les chylomicrons étant de plus grande taille avec une densité plus faible et une plus grande quantité de TGs, ces derniers ont plus de chances d'interagir avec la LPL dans la lumière des vaisseaux coronariens [210] que les VLDL-TG. De plus, la lipolyse des VLDL-TG produit des AGs qui sont ensuite transportés dans les cardiomyocytes via le récepteur CD36 alors que l'hydrolyse des chylomicrons génère une plus grande concentration locale d'AGs qui pénètrent alors dans les cardiomyocytes par des mécanismes de transport passifs de type flip-flop

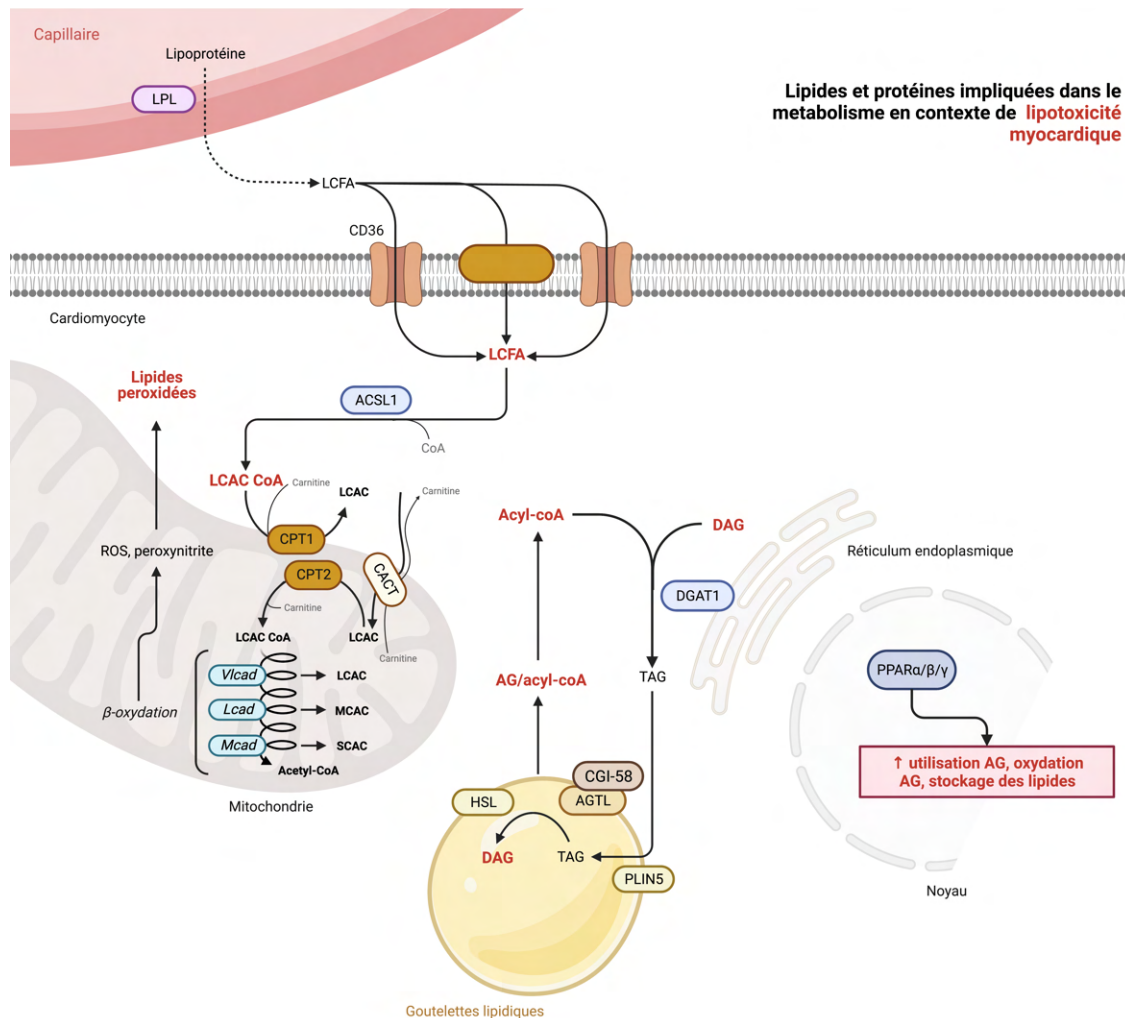


Fig. 15.2. Lipides et protéines impliqués dans le métabolisme en contexte de lipotoxicité myocardique. Adapté d'un modèle créé par Biorender en collaboration avec Anu Jose et Dr. Thomas Puliniilkunnil de la Dalhousie University. Créée avec Biorender.com

et/ou non médiés par CD36 [211]. Basé sur ces mécanismes et sur la diminution de CD36 chez les femelles H-*Lrp1rc*^{KO}, il serait intéressant de cibler les voies alternatives à l'influx d'AGs dans les cardiomyocytes puisque malgré une atteinte des transporteurs des AGs, celles-ci présentent une accumulation intracardiaque. Il serait également intéressant d'analyser la composition des lipoprotéines isolées et de cibler des acteurs clés tels que l'expression et l'activité de la LPL cardiaque afin de mieux comprendre le lien entre une diminution de l'expression de certains transcrits associés aux lipoprotéines et cette accumulation et remodelage lipidique cardiaque. Concernant la LPL, il est cependant peu probable qu'elle soit surexprimée chez les souris H-*Lrp1rc*^{KO} puisque plusieurs études ont relié cette augmentation au développement et la progression de l'insulino-résistance [212, 213]. En revanche, la perte de la LPL cardiaque

entraîne également une insuffisance cardiaque [214, 215] et bien que cela augmente l'utilisation du glucose ni cet effet ni les AGs liés à l'albumine ne peuvent remplacer l'action de la LPL causant alors une diminution de la fraction d'éjection [215]. Pousser les analyses fonctionnelles plus loin en évaluant certains paramètres par échocardiographie serait également intéressants.

Finalement, il a été montré que l'accumulation de céramides et de DAG modifiait les voies de signalisation intracellulaires en favorisant respectivement l'apoptose [216] et l'interférence avec la cascade de signalisation de l'insuline cardiaque, entraînant de ce fait une diminution de l'absorption du glucose [217] (Figure 15.2). Nos résultats du lipidome cardiaque ne montrent qu'une diminution significative de l'entité Cer(d18:1/22:0) chez les femelles H-*Lrpprc*^{KO}, le profil des mâles pour cette entité étant inchangé. Bien qu'il est impossible de tirer une conclusion sur cette observation isolée, il se pourrait que cette différence sexuelle soit une autre preuve d'un décalage dans la progression des manifestations cardiaques associées à la NAFLD. Afin de répondre à cette hypothèse, il serait intéressant de faire de la lipidomique ciblée et de creuser les voies intracellulaires associées aux céramides et aux DAGs.

15.2. Cortisol

La réponse physiologique au stress entraîne la libération de cortisol par les glandes surrénales. Conçu pour augmenter la disponibilité de l'énergie à court terme, le cortisol altère de façon aiguë la sécrétion d'insuline et augmente la production de glucose hépatique. Chez les femelles H-*Lrpprc*^{KO}, nos résultats ont montré une diminution des niveaux circulants de cortisol, indiquant possiblement que leurs organismes tentent de préserver le foie en limitant l'accumulation de lipides par l'augmentation de la clairance du cortisol [188, 218]. Outre la possibilité que cette diminution soit en partie associée à la diminution de l'insulinémie, tel qu'évoqué préalablement, il se pourrait également que le métabolisme du cortisol soit altéré. De ce fait, il serait intéressant de cibler au niveau hépatique et musculaire (cardiaque et squelettique) le récepteur des minéralocorticoïdes (qui possède une forte affinité pour le cortisol) et celui des glucocorticoïdes dont l'affinité pour le cortisol est plus faible, mais également la 11 β -hydroxystéroïde déshydrogénase (11 β -HSD), enzyme modulant l'exposition locale aux glucocorticoïdes via la conversion de cortisone en cortisol et inversement [219]. Des expériences plus poussées pourraient se pencher sur le bon fonctionnement des glandes surrénales, de l'hypophyse dont la production insuffisante d'adrénocorticotrophine (ACTH) peut entraîner un déséquilibre des taux de cortisol ainsi la boucle de rétrocontrôle négatif. De pair avec cette hypothèse, il avait été préalablement observé que les souris H-*Lrpprc*^{KO}, dès 5 semaines d'âge, présentaient un retard

de croissance avec une diminution significative du poids corporel [191] corroborant par le fait même les résultats de cette étude. De plus, dans la littérature, les patients arborant des mutations dans le gène *Lrpprc* présentent des manifestations cérébrales avec notamment des lésions du mésencéphale, siège de l'hypophyse [220]. Compte tenu du fait que des lésions hypophysaires ont un impact sur la libération de l'hormone de croissance (GH) et indirectement, via l'ACTH, sur celle du cortisol [218, 221], il serait intéressant de considérer la possibilité de manifestations cérébrales pouvant alors être à l'origine notamment d'une diminution des niveaux de cortisol, mais également d'une altération de la croissance et de la réponse au stress. Une autre possibilité à ne pas négliger est l'impact de la thermoneutralité sur le sexe féminin. Connue comme étant la plage de température ambiante pour laquelle l'énergie n'est dépensée que pour maintenir le métabolisme de base, la thermoneutralité des souris est plus élevée (~30°C) que celle des humains [222]. Nos installations ne pouvant pas accueillir de chambres thermorégulées, les souris ont été hébergées à une température ambiante inférieure à 30°C (salles tempérées à 22°C) pouvant ainsi avoir un impact sur la dépense l'énergie par l'augmentation de celle-ci afin de réguler leur température corporelle [223]. Étant donné que le cortisol est une hormone thermosensible [224], il se pourrait que cette diminution soit partiellement expliquée par l'absence de thermoneutralité. D'ailleurs, il a été montré qu'en situation de thermoneutralité, les souris femelles mises sous diète riche en gras et présentant une NAFLD avaient un phénotype comparable à celui observé chez l'humain. Aucune résistance à la diète riche en gras n'a été remarquée, manifestation souvent retrouvée chez les femelles sous diète riche en gras et hébergée à température ambiante. En outre, les taux de corticostéroïdes étaient significativement augmentés à 22°C et cela chez les deux sexes. Bien que cette étude ait été réalisée en présence d'une diète riche en gras, les résultats témoignent de l'impact de l'importance de la thermoneutralité sur le métabolisme des souris, particulièrement les femelles, et surtout lorsque des hormones thermosensibles comme le cortisol sont à l'étude. Il est à noter que dans notre étude, les mesures de cortisol ont été faites à 14 semaines alors que les souris n'avaient pas été mises à jeun. De ce fait, nous ne pouvons pas vraiment comparer et/ou essayer d'expliquer ces résultats avec ceux du métabolisme du glucose. Faire une étude avec les souris H-*Lrpprc*^{KO} en situation de thermoneutralité nous permettrait ainsi de diminuer les biais expérimentaux et de réévaluer les taux de cortisol, cette fois-ci après une période de jeûne.

Pour finir sur le métabolisme lipidique, il serait intéressant, dans le futur, de cibler l'impact du tissu adipeux dans la progression de la NAFLD. En effet, même en l'absence d'une augmentation de la masse adipeuse, on ne peut pas exclure un potentiel dysfonctionnement de celui-ci. Regarder l'expression par exemple, des adipokines

(e.g. leptine et adiponectine) permettrait de mieux cerner la dynamique peut être compensatrice de l'axe tissu adipeux-foie sur le phénotype général [225]. Plus généralement, l'AMPK étant un important senseur énergétique, tant dans le foie que les muscles squelettiques, le coeur ou encore le tissu adipeux, cibler son expression dans ces différents tissus permettrait peut être de mieux comprendre l'impact de la délétion hépatique de LRPPRC sur l'équilibre énergétique de l'organisme [226].

16. Métabolisme du glucose

L'homéostasie du glucose dépend partiellement de la gluconéogenèse pendant le jeûne et totalement pendant la famine. La source du glucose utilisé lorsqu'une personne passe de l'état postprandial à l'état de famine a été établie dans des études menées sur des volontaires obèses [227] (Figure 16.1). Les sources initiales de glucose proviennent de l'alimentation (Figure 16.1I). Environ 3h après un repas et dans le but de maintenir l'euglycémie, l'organisme commence à faire appel au glycogène hépatique (Figure 16.1II). Avant que le glycogène ne soit épuisé, soit après environ 5-6h, la néoglucogenèse se met en place et au fur et à mesure où la période de jeûne augmente, sa présence devient de plus en plus nécessaire. Une fois le glycogène épuisé, la néoglucogenèse devient alors seule responsable du maintien de l'euglycémie (Figure 16.1III). Le tissu adipeux et le muscle squelettique fournissent également des substrats pour la synthèse de glucose, que ce soit le glycérol pour le tissu adipeux ou le lactate, le pyruvate, l'alanine et la glutamine pour le muscle squelettique. Après deux jours de jeûne, l'oxydation des acides gras hépatiques et la cétogenèse prennent le relais aux vues d'une disponibilité accrue des corps cétoniques (Figure 16.1IV). Durant ces périodes, l'insulinémie diminue et les taux d'hormones de contre-régulation (e.g. glucagon, catécholamines) augmentent favorisant la production de glycérol par la néoglucogenèse et la lipolyse ainsi que la production d'acides aminés via la protéolyse musculaire [228]. Une diminution de l'insulinémie favoriserait ainsi i) un taux de glucose plasmatique plus élevé et bien que moins utilisé cédant la place à la néoglucogenèse et la glycogenèse, ii) un taux d'AGs plasmatique plus élevé via l'activation de la lipolyse dans le tissu adipeux et iii) un taux de corps cétoniques plus élevé en canalisant les AGs vers la formation de cétones lorsque l'oxydation du glucose est interrompue. Tous ces mécanismes seraient alors enclenchés afin de s'assurer qu'en période de jeûne et de famine, les réserves corporelles (tissu adipeux, muscles) soient utilisées au bon moment, au bon endroit et de manière optimale pour la survie de l'organisme.

Bien que nos travaux de recherche se portent sur un modèle murin ne présentant aucun signe d'obésité, l'explication des événements se produisant lors d'un jeûne chez des sujets atteints d'obésité a permis d'élargir nos diverses pistes de réflexion.

16.1. Implication du pancréas

Le glucagon, produit par les cellules α pancréatiques, contribue au maintien de l'euglycémie chez l'humain en augmentant, pendant le jeûne, la production hépatique de glucose par stimulation de la glycogénolyse et de la néoglucogenèse [229]. Il est maintenant bien compris que la production hépatique de glucose est finement régulée par le travail synergique de l'insuline et du glucagon comme démontré par exemple, par la présence de récepteurs à l'insuline sur les cellules α pancréatiques inhibant alors la sécrétion de glucagon [230, 231]. De ce fait, à l'état de jeûne, la production endogène de glucose représente un équilibre entre les effets stimulants du glucagon et les effets inhibiteurs de l'insuline.

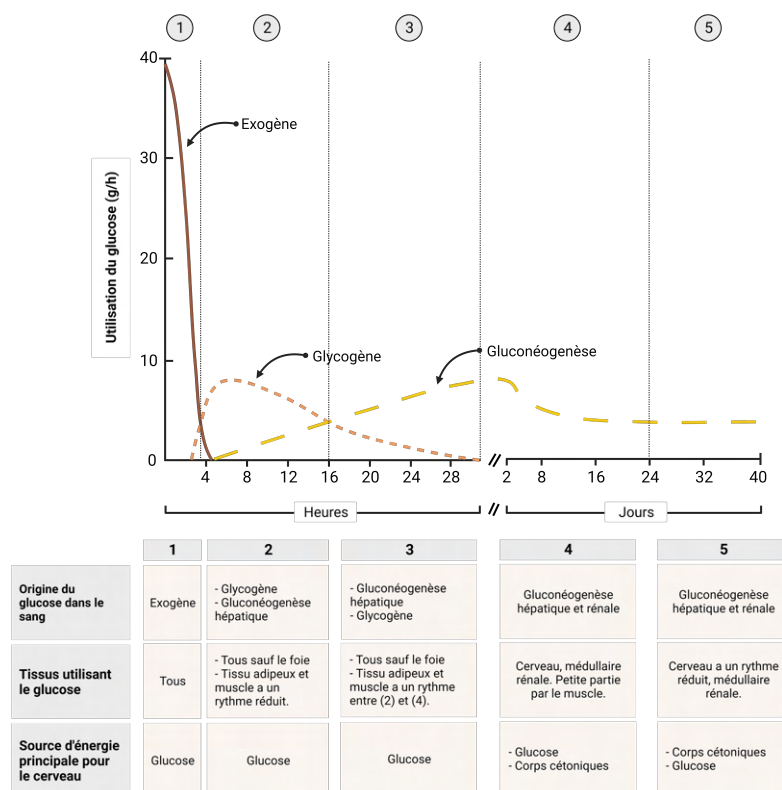


Fig. 16.1. Origine des substrats utilisés pour maintenir les niveaux de glucose sanguin pendant le jeûne et la famine chez des volontaires souffrant d'obésité. Adapté de Cahill, G.F., 2006. Fuel metabolism in starvation. *Annu. Rev. Nutr.* 26, 1–22. Créée avec Biorender.com

Nos résultats indiquent que la déficience hépatique en LRPPRC entraîne un profil hypoglycémique à jeun et une sensibilité accrue à l'insuline, ce profil étant exacerbé chez les mâles. Il semble important de mentionner que l'injection d'insuline chez les femelles H-*Lrpprc*^{KO} ont eu un impact drastique sur la glycémie à tel point que sur dix souris, quatre d'entre elles avaient une glycémie ≤ 1 mmol/L après 30 minutes, nous laissant parfois peu de temps pour agir avant de convulser. De manière surprenante, autant les mâles et que les femelles H-*Lrpprc*^{KO} ont eu beaucoup de difficulté à revenir à une glycémie normale au bout de 120 minutes. L'ensemble de ces observations laisse à penser que la synthèse et/ou la régulation de l'insuline puissent être altérées. Prenons l'exemple du diabète de type 1 non traité ou mal équilibré qui entraîne la présence, chez les patients, d'une hyperglycagonémie. Cette hypersécrétion de glucagon semble être secondaire à une carence en insuline puisque la correction de l'hyperglycémie par insulinothérapie normalise la glucagonémie [232]. De ce fait, puisque les souris H-*Lrpprc*^{KO} ne sont pas hyperglycémiantes, mais que contre-intuitivement, elles présentent une hypoinsulinémie, ces observations faites chez les diabétiques de type 1 peuvent nous aider à orienter nos futures recherches : la perte hépatique de LRPPRC pourrait-elle altérer la fonction des îlots pancréatiques et/ou entraîner un déficit, ou à l'envers un excès, d'autres hormones pancréatiques (e.g. insuline, glucagon, somatostatine)? Compte tenu du fait que les souris H-*Lrpprc*^{KO}, et en particulier les femelles compte tenu de leurs plus grandes sensibilités à l'insuline, avaient du mal à revenir à une glycémie normale durant l'ITT, il se pourrait que les mécanismes de contre-régulation de l'insuline soient altérés (e.g. glucagon, norépinéphrine, épinéphrine, GH et cortisol [233, 234]) et que par conséquent, l'organisme, pour se protéger de l'effet d'une dose trop importante d'insuline, diminue ses concentrations sanguines basales. Cela pourrait également être le cas dans des conditions basales. Regarder tout du moins l'insulinémie, la glucagonémie, la cortisolémie dans des conditions de jeûne prolongé durant un ITT et un OGTT pourrait donc servir à cerner les mécanismes qui sous-tendent l'hypoinsulinémie, l'hypoglycémie asymptomatique après un simple jeûne ainsi que l'hypoglycémie sévère suite à un ITT. Par ailleurs, connaissant l'effet des incrétines sur l'homéostasie du glucose, il serait intéressant de regarder l'expression et la sécrétion de GLP-1 (glucagon-like peptide-1) (e.g. ipGTT vs OGTT), hormone de satiété sécrétée par les cellules entéro-endocrines en réponse à un repas [235, 236].

16.2. Implication et impact sur les muscles squelettiques

Tel que mentionné préalablement, dans une situation de jeûne prolongé et une fois les réserves de glycogène épuisées, la néoglucogenèse devient la seule responsable

du maintien de l'euglycémie. Viennent alors en aide le tissu adipeux avec la libération de glycérol, et les muscles squelettiques avec la production de lactate et le pyruvate via le cycle de Cori ainsi que l'alanine et la glutamine via la protéolyse (Figure 16.2). La combinaison d'une demande énergétique accrue avec un épuisement des réserves hépatiques de glycogène peut également enclencher ce mécanisme.

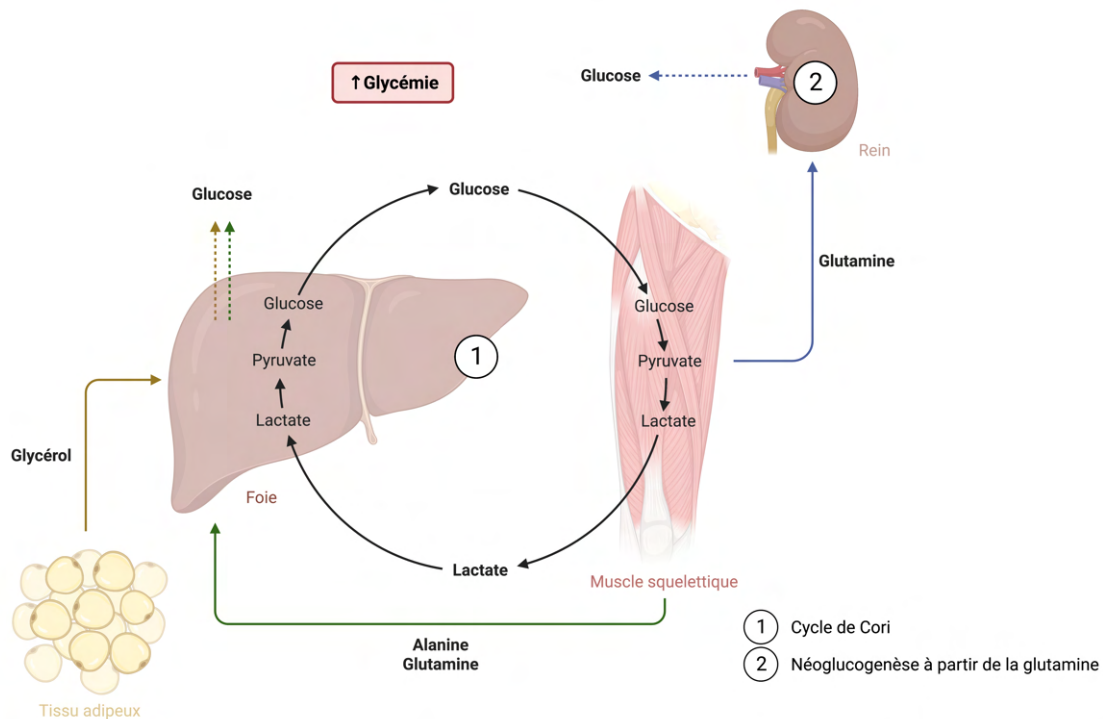


Fig. 16.2. Voies de la néoglucogenèse impliquant différents précurseurs non glucidiques tels que le pyruvate, le lactate, le glycérol et certains acides aminés.
Créée avec Biorender.com

Compte tenu du profil glycémique et insulinémique des souris *H-Lrp1^{KO}*, nous avons émis l'hypothèse qu'en présence de sévères perturbations hépatiques, celles-ci empièteraient sur les réserves glycogéniques affaiblissant ainsi la capacité du foie à enclencher la néoglucogenèse durant une période de jeûne. Cet épuisement avait également été retrouvé en condition d'hypersensibilité à l'insuline [237]. Cette situation pourrait expliquer la lutte pour le maintien d'une homéostasie entre un foie dont les réserves glycogéniques sont déplétées et un muscle squelettique hypersensible à l'insuline et métabolisant rapidement le glucose. Par ailleurs, un déséquilibre des substrats métabolites ou une altération de la signalisation moléculaire associée à la néoglucogenèse peut entraîner une hypoglycémie. De ce fait, afin de vérifier cette hypothèse nous pourrions i) évaluer les réserves de glycogène par histologie (coloration avec l'acide périodique de Schiff (PAS), [238, 239], ii) isoler et mettre en culture les cellules musculaires satellites afin d'analyser la capacité oxydative des cellules avec du

lactate marqué et des acides aminés tels que l'alanine et la glutamine [240]. Tel que décrit dans Harris RA., beaucoup d'autres molécules sont à différents égards utilisées comme substrats pour la néoglucogenèse de même que pour les enzymes y étant impliqués laissant donc de nombreuses de réflexion [240] quant aux mécanismes de compensation chez la souris hépato-déficiente pour LRPPRC.

En outre, les résultats d'OGTT, démontrant un rapide contrôle de la glycémie chez les mâles, laissent entrevoir la possibilité d'une recapture rapide (entre 15 et 30 minutes après gavage) du glucose par les muscles. En raisonnant par l'inverse, le développement du DT2 peut être causé par une réponse inadéquate de la part de l'organisme face à une élévation de la glycémie. Cet état d'hyperglycémie peut alors être dû à trois principales altérations: une production accrue de glucose par le foie, une capacité réduite du pancréas à sécréter de l'insuline et une action altérée de l'insuline sur les muscles et le tissu adipeux [241, 242]. Étant donné que nos résultats ont également été associés à une faible insulinémie malgré l'administration d'un bolus de glucose, la sécrétion d'insuline par le pancréas et son bon fonctionnement sur les tissus périphériques ne sont probablement pas la cause de cette réponse rapide. Cependant, tel que mentionné plus haut, il se pourrait qu'une altération des mécanismes de contre-régulation facilite la tâche de l'insuline qui n'a alors pas à compétitionner avec les taux des hormones adverses et qui est en présence d'un organisme y étant fortement sensible.

Finalement, la présence d'un dimorphisme sexuel dans la réponse à un bolus de glucose pourrait être associée à un mécanisme de protection de la part des femelles *H-Lrpprc^{KO}*. En effet, il est maintenant évident que les femelles, avant la ménopause, présentent une plus grande sensibilité à l'insuline avec un métabolisme du glucose plus délicatement modulé. De ce fait, compte tenu i) de la présence d'un profil hypoglycémique à jeun, ii) de la réponse drastique observée lors des ITT et iii) de l'absence de différence suite à l'administration d'un bolus de glucose avec insulinémie inchangée après 30 minutes, il se pourrait que l'organisme des femelles *H-Lrpprc^{KO}*, par souci de protection, ait un seuil insulinémique à partir duquel une recapture plus efficace du glucose par les muscles ne serait qu'alors préjudiciable. Cela pourrait être expliqué par des changements au niveau des mécanismes de contre-régulation de l'insuline, tel que mentionné dans la sous-section sur l'implication du pancréas, mais pourrait également être associé à un changement dans l'expression et/ou la dynamique des transporteurs du glucose insulino-dépendants (GLUT4) ainsi que ces voies intracellulaires (voies AKT-dépendantes) [243, 244, 245, 246]. De ce fait, il serait intéressant de pousser les analyses plus loin en regardant le métabolisme du glucose au niveau musculaire via l'expression des GLUT à l'état basal et suite à l'induction d'une

réponse se voulant hypo- ou hyperglycémique. Cibler AKT, un noeud critique dans la signalisation intracellulaire de l'insuline, pourrait également être intéressant.

16.3. Impact sur le muscle cardiaque

Le métabolisme énergétique cardiaque est complexe. Telle que décrite par Neubauer S., la machinerie métabolique comporte trois principales composantes soit i) l'utilisation des substrats provenant de l'alimentation (AGs, glucose) par la β -oxydation, la glycolyse puis le cycle de Krebs, ii) la phosphorylation oxydative par l'ETC permettant alors la production d'ATP et iii) le transfert de cet ATP via un transfert d'énergie lié à la créatine kinase permettant son utilisation par les myofibrilles nécessaires à la contraction cardiaque [247]. Cet apport énergétique ne peut être entretenu que par le métabolisme oxydatif de substrats métaboliques que sont les acides gras et les carbohydrates. Dans l'évolution vers l'insuffisance cardiaque, les trois composantes décrites par Neubauer S. sont progressivement touchées.

Pour récapituler, nos résultats concernant l'impact de la délétion hépatique de *Lrp-prc* sur les manifestations cardiaques démontrent deux profils distincts et sexe-dépendants. D'un côté les mâles présentaient une légère dysfonction diastolique soutenue par la présence d'une légère dysfonction des mitochondries cardiaques et un remodelage du profil des lipoprotéines plasmatiques et dans une certaine mesure, du lipodome cardiaque. Dans l'ensemble, ces résultats mettent en évidence un profil typiquement athérogène conférant un risque accru de complications cardiovasculaires. À l'inverse, les femelles n'étaient pas affectées par une quelconque dysfonction cardiaque, mais présentaient tout de même des atteintes cardiométaboliques. Ces preuves étaient étayées par une altération de l'intégrité mitochondriale et de la β -oxydation, mais également par une diminution du profil des lipoprotéines circulantes, qui, dans l'ensemble, ont conduit à une accumulation intracardiaque de triglycérides délétères. À la lumière du remodelage du lipidome cardiaque, nous pourrions comparer le phénotype cardiaque des femelles H-*Lrp-prc*^{KO} à celui observé dans une situation de cardiomyopathie diabétique.

Le coeur tirant son énergie principalement de l'oxydation des acides gras, des mécanismes non hormonaux font en sorte que lorsque le glucose et les AGs sont tous deux présents, le coeur utilise préférentiellement les AGs afin de conserver le glucose pour le cerveau en l'absence de nourriture ou de favoriser la glycogénèse postprandiale dans les muscles [248, 249, 250]. Connue sous le nom de cycle de Randle, ce phénomène fait en sorte que l'oxydation des AGs réduise l'utilisation du glucose [251]. Bien que ce phénomène de conservation du glucose joue un rôle important dans la survie pendant les périodes de jeûne, il devient problématique lorsque la flexibilité métabolique

est altérée comme chez les patients diabétiques. En effet, dans le myocarde du diabétique, un des changements majeurs est l'oxydation prédominante des AGs au profit d'un déclin de l'oxydation du glucose entraînant *in fine* un dysfonctionnement du ventricule gauche via l'induction d'un stress oxydatif [252]. Mécanistiquement, plusieurs études mettent de l'avant le fait que l'excès d'AGs dans le sang inhiberait la transmission du signal insulinique [253, 254, 255] causant ainsi une réduction du transport du glucose via la diminution de l'expression de GLUT4 [256]. De ce fait, le métabolisme énergétique cardiaque deviendrait de plus en plus dépendant de l'oxydation des AGs. Chez les femelles H-*Lrpprc*^{KO}, ce rationnel corrèle avec les résultats démontrant une diminution de l'ensemble des transporteurs et acteurs de la β -oxydation mitochondriale ainsi qu'une altération de la respiration AG-dépendante. Cependant, il est intéressant de noter que des résultats préliminaires sur le métabolisme cardiaque du glucose montrent une expression inchangée du transporteur basal GLUT1, mais une tendance à la baisse dans l'expression du transporteur insulino-dépendant, GLUT4 et cela uniquement chez les femelles (données non présentées). Bien que ces résultats semblent à priori se contredire, il se pourrait que l'organisme des femelles H-*Lrpprc*^{KO} cherche à se protéger en minimisant son métabolisme énergétique cardiaque pour éviter de le surcharger. Compte tenu du manque de données dans cette présente étude, il apparaît crucial d'approfondir la caractérisation du phénotype cardiaque en regardant par exemple la répartition des substrats en perfusant le coeur en mode travaillant, appareil largement utilisé au laboratoire. Quant aux mâles H-*Lrpprc*^{KO}, outre le potentiel lien, préalablement discuté, entre dynamique mitochondriale altérée et dysfonction diastolique, d'autres pistes de réflexion peuvent être envisageables. En effet, étant donné que les mâles ne semblent ni présenter de défaut de l'oxydation des AGs ni d'atteinte au niveau de la fonction mitochondriale, regarder le mécanisme du transfert énergétique via la créatine kinase et le ratio phosphocréatine:ATP pourrait être pertinent [247].

17. Hormones sexuelles

La NAFLD est une maladie sexo-dimorphique et cette étude en plus de souligner cela, montre également un dimorphisme sexuel dans les répercussions extra-hépatiques et notamment cardiovasculaires. Dans le futur du laboratoire, il serait de ce fait intéressant de comprendre cette différence mâle-femelle en ciblant les hormones sexuelles.

17.1. Oestrogènes

Chez les femelles H-*Lrp1*^{KO}, l'absence d'altérations fonctionnelles à 14 semaines pourrait s'expliquer par la différence d'hormones stéroïdiennes sexuelles. Les oestrogènes sont de puissantes hormones stéroïdiennes présentes à des niveaux élevés chez la femme de l'adolescence à la ménopause et à des niveaux faibles chez l'homme.

Les femmes possèdent un meilleur contrôle glycémique, une plus grande sensibilité hépatique et périphérique à l'insuline ainsi qu'une production hépatique de glucose réduite par rapport aux hommes [257, 258, 259]. De ce fait, puisque la régulation de la signalisation hépatique est sexo-dimorphique [260, 261], la susceptibilité de développer une NAFLD sont différents. En effet, chez de jeunes femmes ovariectomisées [171] ou souffrant d'autres dysfonctionnements reproductifs caractérisés par des niveaux d'oestrogènes altérés (e.g. syndrome des ovaires polykystiques) [262, 263], celles-ci présentaient une incidence accrue de NAFLD par rapport aux jeunes femmes témoins. Ces résultats ont alors été corrélés avec une concentration sérique significativement plus faible de 17 β -estradiol, l'oestrogène la plus significativement active [263], conférant alors un rôle protecteur à cette hormone.

Mécanistiquement, les oestrogènes ont un impact à la fois au niveau nucléaire et mitochondrial. La réponse oestrogène-dépendante la plus rapide implique les récepteurs aux oestrogènes (ERs; e.g. GPER1) présent à la membrane ainsi que la voie de signalisation PI3K-AKT et ERK1/2 dépendantes. La réponse nucléaire est cependant plus lente puisque le complexe ER α/β -oestrogène, agissant comme facteur de transcription, est transloqué au noyau afin d'activer ou de réprimer l'expression génétique. *In fine*, la spécificité de la réponse aux oestrogènes est régulée par divers ERs et semble avoir des effets spécifiques dans le remodelage cardiaque entre autres. Par exemple, des études fondamentales suggèrent que le traitement par oestrogènes préviendrait la nécrose et l'apoptose des cellules cardiaques et endothéliales et atténueraient également l'hypertrophie cardiaque pathologique [264].

L'impact hépatique des oestrogènes a, à de nombreuses reprises, été démontré par l'ovariectomie de modèles animaux. De manière générale, les femelles ovariectomisées (OVX) vont développer une insulino-résistance, une augmentation du flux d'AG ainsi que de la DNL, une réduction de l'oxydation et de la sécrétion d'AG conduisant alors à une prise de poids, une augmentation de la masse grasse et une stéatose hépatique [262, 265, 266, 267]. En outre, la supplémentation en 17 β -estradiol chez les femelles OVX entraîne une amélioration de la sensibilité à l'insuline, la suppression de la néoglucogenèse [268], prévient le dépôt de graisses hépatiques en inhibant la DNL [265, 269], facilite l'exportation des VLDL via l'augmentation de leurs productions

hépatiques [270, 271] et soutient la β -oxydation mitochondriale des AGs en induisant l'expression de PPAR α [269]. La perte des récepteurs ER α et GPER1 puis la restauration du phénotype ont eu des effets similaires à l'ovariectomie (revue dans: [272]). L'importance des oestrogènes chez les hommes a également fait l'objet d'études. Tout comme chez les femmes, les oestrogènes régulent l'homéostasie du glucose, la sensibilité à l'insuline, le métabolisme des lipides et préviennent le développement de la stéatose hépatique [273, 274]. En effet, chez des modèles murins, une carence en oestrogènes via des mutations codant pour l'aromatase, enzyme permettant la biosynthèse d'oestrogènes à partir de la testostérone, a eu pour effet d'altérer les métabolismes hépatiques du glucose et des lipides [275, 276] et l'administration de 17 β -oestradiol renverse ce profil stéatosique via PPAR α et de la même manière que chez les femelles [277, 278, 279]. Ces résultats ont également été observés suite à la perte des récepteurs ER α et GPER1 puis à la restauration du phénotype [280, 281, 282, 283]. Ces évidences laissent donc entrevoir la possibilité d'une atteinte des taux d'oestrogènes et/ou de leurs récepteurs chez les femelles et/ou les mâles H-*Lrpprc*^{KO}. Cependant, chez les femelles, spéculer sur la sévérité d'une potentielle atteinte semble cependant difficile puisqu'à priori, la littérature ne recense aucune donnée fondamentale sur l'impact d'une déficience en oestrogènes chez des modèles murins présentant une NAFLD sans obésité. Nous sommes cependant optimistes puisque, bien que non associé à la NAFLD sans obésité, une étude a fourni des preuves comme quoi chez des rates ovariectomisées, les premiers signes de dysfonctionnement cardiaque n'apparaissent qu'à 12 semaines [284]. Nous pouvons donc supposer que même en présence d'une carence en oestrogènes, les femelles H-*Lrpprc*^{KO} pourraient développer une dysfonction cardiaque avec ou sans fibrose plus tard dans la vie. En outre, il est important de mentionner que l'altération mitochondriale de la biogenèse, de la dynamique et du métabolisme des acides gras chez les femelles suggère une altération de l'intégrité mitochondriale. Ce profil serait très probablement exacerbé en présence d'un stress endogène et pourrait également déclencher un phénotype fonctionnel. De ce fait, les perspectives seraient d'utiliser ce protocole en y incluant cependant un stress métabolique (e.g. diète riche en gras, constriction de l'aorte transversale afin d'induire une surcharge de pression) avec ou sans ovariectomie. Cibler les niveaux circulants d'oestrogènes, regarder l'expression des différents récepteurs (ER α/β et GPER1) et éventuellement essayer de mieux comprendre le rôle des oestrogènes en supplémentant les femelles OVX avec du 17 β -oestradiol serait de mise. Chez les mâles *Lrpprc* KO, ce protocole pourrait également être appliqué, mais cette fois-ci en délétant les gènes codant pour les ERs dans des organes cibles tels que le coeur. Des salles en situation de thermoneutralité seraient importantes afin de pouvoir optimiser la comparaison entre les sexes et la transposition des mécanismes

physiopathologiques vers l'humain. En outre, et c'est d'ailleurs une des limitations de cette étude, il serait primordial d'avoir un suivi plus long, en commençant peut être plus tôt que 5 semaines et en incluant peut être l'idée d'y ajouter une étude de survie. Étant donné que nous sommes en présence d'un modèle ayant une pathologie évolutive, mais également sexo-dimorphique, faire une étude longitudinale avec un suivi périodique serait idéal.

17.2. Testostérone

Dans le foie stéatosique, les androgènes et leurs récepteurs (AR) contribuent de manière directe ou indirecte au phénotype hépatique. D'un côté et à l'aide de modèles animaux knock-out pour la 5α -réductase et/ou des ARs, des études ont montrés qu'en agissant via les voies dépendantes de la GH [285, 286, 287, 288], la déficience en androgènes pouvait entraîner une stéatose hépatique et une résistance à l'insuline [289]. De l'autre côté, d'autres études ont montré que les androgènes, par le biais du remodelage de la chromatine, régulaient l'accessibilité de l'ADN à plusieurs facteurs de transcription [290, 228]. La littérature s'est également intéressée à l'effet de la testostérone sur les cellules β pancréatiques, mais certains résultats se contredisent concernant son effet potentiellement protecteur *versus* délétère dans l'hyperglycémie [291, 292]. Au niveau cardiaque, il semblerait que la recherche sur l'association entre la testostérone et les MCVs demeure obscure [293]. Cependant, les potentiels mécanismes impliqués comprennent l'activation des voies de signalisation associées au récepteur de l'insuline (AKT, ERK et mTOR), mais également l'expression accrue du récepteur à l'insuline, d'AKT-2, de GLUT4 ainsi que des enzymes de la glycolyse [294]. À la lumière de ces évidences, il serait intéressant de regarder les taux d'androgènes chez les souris H-*Lrp1rc*^{KO} et de cibler les ARs afin de comprendre l'implication d'une déficience en androgènes dans la physiopathologie de la NAFLD sans obésité et ces répercussions cardiovasculaires. Cela est d'autant plus intéressant que chez les mâles H-*Lrp1rc*^{KO}, ces derniers présentent un métabolisme du glucose plus sévèrement atteint que les femelles laissant entrevoir la possibilité de l'implication partielle de la testostérone dans cette différence sexuelle.

17.3. Hormone de croissance

Finalement, la GH circulante a démontré être cruciale dans l'expression sexe-dépendante des gènes hépatiques. Dans des conditions physiologiques, les gonades régulent la sécrétion de la GH de manière sexe-dépendante. Chez les mâles, sa sécrétion est pulsatile tandis que chez les femelles celle-ci est plutôt continue [295, 296]. Dans l'ensemble, la GH régule une grande partie des protéines plasmatiques et

urinaires, mais également les enzymes consacrées au métabolisme des stéroïdes et divers récepteurs et molécules de signalisation impliqués dans un large éventail de processus physiologiques [297, 296, 298]. Cette régulation est assurée par l'interaction avec des voies de signalisations intracellulaires, mais dépend également de la régulation sexe-spécifique de la méthylation de l'ADN et de la structure de la chromatine [296, 299, 300]. Dans notre étude, cibler la GH serait intéressant puisqu'un des principaux problèmes associés à une lésion de la glande pituitaire, pouvant causer une atténuation de la sécrétion d'ACTH et de cortisol, est la déficience en GH [221].

18. Conclusion et perspectives

Les travaux de ce mémoire avaient pour objectif de caractériser chez la souris hépato-déficente pour le gène *Lrp1rc*, les changements métaboliques qui sous-tendent les manifestations cardiaques de la NAFLD sans obésité. La présence d'un éventuel dimorphisme sexuel devait également être évaluée. Ce modèle murin avait préalablement fait l'objet d'une caractérisation hépatique et circulante révélant alors la présence d'hépatopathie mitochondriale en absence d'obésité ainsi qu'une signature lipidique circulante récapitulant dans une certaine mesure celle observée chez les patients atteints de NAFLD.

Nos résultats ont dévoilé un important remodelage phénotypique sexe-dépendant allant au-delà des lésions hépatiques. En effet, les mâles un peu plus que les femelles présentaient une hypoglycémie à jeun et une sensibilité accrue à l'insuline. Les mâles, un peu plus que les femelles, présentaient une hypoglycémie à jeun et une sensibilité accrue à l'insuline, reflétant une altération du métabolisme du glucose potentiellement causée par une dyshoméostasie dans l'axe foie-organes périphériques. Ils présentaient également un léger dysfonctionnement diastolique soutenu par la présence d'un léger dysfonctionnement mitochondrial cardiaque, un remodelage du profil des lipoprotéines circulantes et, dans une certaine mesure, du lipidome cardiaque. Dans l'ensemble, ces résultats indiquent un profil typiquement athérogène augmentant le risque de complications cardiovasculaires. Il est intéressant d'observer qu'à l'inverse, les femelles ne manifestaient pas de dysfonction cardiaque, mais présentaient tout de même une atteinte cardiométabolique. Ces preuves ont été étayées par une altération de l'intégrité mitochondriale et de la β -oxydation, mais aussi par une diminution du profil des lipoprotéines circulantes qui, dans l'ensemble, ont conduit à une accumulation intracardiaque de triglycérides délétères. Devant ces preuves, il se pourrait que les hormones sexuelles retardent l'apparition de complications fonctionnelles. Collectivement, ces résultats indiquent que les défauts métaboliques dans le foie peuvent entraîner des anomalies significatives dépendantes du sexe qui affectent à la fois le phénotype mitochondrial/métabolique et la fonction contractile indépendamment de l'obésité. Ce modèle expérimental pourrait s'avérer utile pour mieux comprendre les mécanismes qui sous-tendent la variabilité liée au sexe dans la progression de la NAFLD maigre chez l'homme.

Dans cette étude, la principale difficulté rencontrée a été d'essayer de comprendre les mécanismes sous-tendant les manifestations cardiaques alors que les mâles et les femelles présentaient un profil complètement antagoniste. Une des multiples pistes

de réflexion se baserait sur la présence d'une divergence dans le profil des lipoprotéines plasmatiques, dont l'implication sur le remodelage du lipidome cardiaque est encore à élucider. Pour résumer brièvement les perspectives futures avec ce modèle, notre laboratoire aimerait cibler au niveau hépatique les réserves de glycogène ainsi que les principales enzymes responsables de son métabolisme. Afin de mieux cerner les atteintes du métabolisme du glucose, nous aimerions marquer le lactate afin d'évaluer l'implication du cycle de Cori. Au niveau cardiaque, une des priorités serait de perfuser le coeur en mode travaillant afin de voir quels substrats le coeur utilise, comment et dans quelles proportions. Finalement, afin de comprendre le dimorphisme sexuel observé dans ces différents systèmes, nous aimerions cibler les niveaux circulants d'oestrogènes et d'androgènes, évaluer l'expression de GPER1 ainsi que $ER\alpha$ et $ER\beta$ au niveau de la membrane plasmique et de la mitochondrie. Dans un second temps, il serait intéressant de regarder, en situation de thermoneutralité, l'impact d'un stress métabolique tel qu'une diète riche en gras ou une constriction de l'aorte transversale. L'idée serait de procéder à l'ovariectomie d'une partie des femelles H-*Lrp1*^{KO} et de supplémenter certaines de ces souris avec du 17 β -oestradiol. Nous nous attendons à ce que l'ovariectomie accélère le phénotype cardiaque et que l'ajout d'un stress endogène vienne plus sérieusement aggraver le phénotype. Finalement, étant donné que nous sommes en présence d'un modèle avec une maladie évolutive sexo-dimorphisme, faire une étude longitudinale avec un suivi périodique serait idéal. Il serait nécessaire de suivre ces souris plus longtemps, en commençant peut-être plus tôt que 5 semaines et en incluant l'idée d'y ajouter une étude de survie.

Références bibliographiques

- [1] Fahy E, Subramaniam S, Murphy RC, Nishijima M, Raetz CRH, Shimizu T, et al. Update of the LIPID MAPS comprehensive classification system for lipids. *J Lipid Res.* 2009-04;50 Suppl:S9-14.
- [2] Seebacher F, Zeigerer A, Kory N, Kraemer N. Hepatic lipid droplet homeostasis and fatty liver disease. *Semin Cell Dev Biol.* 2020-12;108:72-81.
- [3] Browning JD, Szczepaniak LS, Dobbins R, Nuremberg P, Horton JD, Cohen JC, et al. Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the United States: impact of ethnicity. *Hepatology.* 2004-12;40(6):1387-95.
- [4] Alves-Bezerra M, Cohen DE. Triglyceride Metabolism in the Liver. *Compr Physiol.* 2017-12-12;8(1):1-8.
- [5] Cohen JC, Horton JD, Hobbs HH. Human fatty liver disease: old questions and new insights. *Science.* 2011-06-24;332(6037):1519-23.
- [6] Xu R, Pan J, Zhou W, Ji G, Dang Y. Recent advances in lean NAFLD;153:113331.
- [7] Galiero R, Caturano A, Vetrano E, Cesaro A, Rinaldi L, Salvatore T, et al. Pathophysiological mechanisms and clinical evidence of relationship between Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) and cardiovascular disease;22(3):755-68.

- [8] Nassir F, Rector RS, Hammoud GM, Ibdah JA. Pathogenesis and Prevention of Hepatic Steatosis. *Gastroenterol Hepatol (N Y)*. 2015-03;11(3):167-75.
- [9] Rosso N, Bellentani S. Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Wide Spectrum Disease. In: Radu-Ionita F, Pirsopoulos NT, Jinga M, Tintoiu IC, Sun Z, Bontas E, editors. *Liver Diseases: A Multidisciplinary Textbook*. Springer International Publishing; 2020. p. 273-84.
- [10] 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*. 2016-07;64(1):73-84.
- [11] Mitra S, De A, Chowdhury A. Epidemiology of non-alcoholic and alcoholic fatty liver diseases. *Transl Gastroenterol Hepatol*. 2020;5:16.
- [12] Inoue Y, Qin B, Poti J, Sokol R, Gordon-Larsen P. Epidemiology of Obesity in Adults: Latest Trends. *Curr Obes Rep*. 2018-12;7(4):276-88.
- [13] Polyzos SA, Kountouras J, Mantzoros CS. Obesity and nonalcoholic fatty liver disease: From pathophysiology to therapeutics. *Metabolism*. 2019-03;92:82-97.
- [14] Calzadilla Bertot L, Adams LA. The Natural Course of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Int J Mol Sci*. 2016-05-20;17(5):E774.
- [15] Birkenfeld AL, Shulman GI. Nonalcoholic fatty liver disease, hepatic insulin resistance, and type 2 diabetes. *Hepatology*. 2014-02;59(2):713-23.
- [16] Arab JP, Arrese M, Trauner M. Recent Insights into the Pathogenesis of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Annu Rev Pathol*. 2018-01-24;13:321-50.
- [17] Day CP, James OF. Steatohepatitis: a tale of two "hits"? *Gastroenterology*. 1998-04;114(4):842-5.
- [18] Day CP. Pathogenesis of steatohepatitis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2002-10;16(5):663-78.
- [19] Buzzetti E, Pinzani M, Tsochatzis EA. The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Metabolism*. 2016-08;65(8):1038-48.
- [20] Tilg H, Adolph TE, Moschen AR. Multiple Parallel Hits Hypothesis in Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Revisited After a Decade. *Hepatology*. 2021-02;73(2):833-42.
- [21] Marchesini G, Brizi M, Bianchi G, Tomassetti S, Bugianesi E, Lenzi M, et al. Nonalcoholic fatty liver disease: a feature of the metabolic syndrome. *Diabetes*. 2001-08;50(8):1844-50.
- [22] Godoy-Matos AF, Silva Júnior WS, Valerio CM. NAFLD as a continuum: from obesity to metabolic syndrome and diabetes. *Diabetol Metab Syndr*. 2020;12:60.
- [23] Donnelly KL, Smith CI, Schwarzenberg SJ, Jessurun J, Boldt MD, Parks EJ. Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Invest*. 2005-05;115(5):1343-51.
- [24] Schreuder TCMA, Verwer BJ, van Nieuwkerk CMJ, Mulder CJJ. Nonalcoholic fatty liver disease: an overview of current insights in pathogenesis, diagnosis and treatment. *World J Gastroenterol*. 2008-04-28;14(16):2474-86.
- [25] Schultz JR, Tu H, Luk A, Repa JJ, Medina JC, Li L, et al. Role of LXRs in control of lipogenesis. *Genes Dev*. 2000-11-15;14(22):2831-8.
- [26] Xu X, So JS, Park JG, Lee AH. Transcriptional control of hepatic lipid metabolism by SREBP and ChREBP. *Semin Liver Dis*. 2013-11;33(4):301-11.
- [27] Carmen GY, Víctor SM. Signalling mechanisms regulating lipolysis. *Cell Signal*. 2006-04;18(4):401-8.
- [28] Pagano G, Pacini G, Musso G, Gambino R, Mecca F, Depetris N, et al. Nonalcoholic steatohepatitis, insulin resistance, and metabolic syndrome: further evidence for an etiologic association. *Hepatology*. 2002-02;35(2):367-72.

- [29] Choudhury J, Sanyal AJ. Insulin resistance and the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. *Clin Liver Dis.* 2004-08;8(3):575-94, ix.
- [30] Polyzos SA, Kountouras J, Zavos C. Nonalcoholic fatty liver disease: the pathogenetic roles of insulin resistance and adipocytokines. *Curr Mol Med.* 2009-04;9(3):299-314.
- [31] Ortega-Prieto P, Postic C. Carbohydrate Sensing Through the Transcription Factor ChREBP. *Front Genet.* 2019;10:472.
- [32] Stefan N, Kantartzis K, Häring HU. Causes and metabolic consequences of Fatty liver. *Endocr Rev.* 2008-12;29(7):939-60.
- [33] Postic C, Girard J. Contribution of de novo fatty acid synthesis to hepatic steatosis and insulin resistance: lessons from genetically engineered mice. *J Clin Invest.* 2008-03;118(3):829-38.
- [34] Peverill W, Powell LW, Skoien R. Evolving concepts in the pathogenesis of NASH: beyond steatosis and inflammation. *Int J Mol Sci.* 2014-05-14;15(5):8591-638.
- [35] Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue;112(12):1796-808.
- [36] Bulló M, García-Lorda P, Megias I, Salas-Salvadó J. Systemic Inflammation, Adipose Tissue Tumor Necrosis Factor, and Leptin Expression;11(4):525-31.
- [37] Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization;25(12):677-86.
- [38] Lumeng CN, Bodzin JL, Saltiel AR. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization;117(1):175-84.
- [39] Kakuma T, Lee Y, Higa M, Wang Zw, Pan W, Shimomura I, et al. Leptin, troglitazone, and the expression of sterol regulatory element binding proteins in liver and pancreatic islets. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000-07-18;97(15):8536-41.
- [40] Jiménez-Cortegana C, García-Galey A, Tami M, Del Pino P, Carmona I, López S, et al. Role of Leptin in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Biomedicines.* 2021-06-30;9(7):762.
- [41] Tilg H, Moschen AR. Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol.* 2006-10;6(10):772-83.
- [42] Tilg H, Hotamisligil GS. Nonalcoholic fatty liver disease: Cytokine-adipokine interplay and regulation of insulin resistance. *Gastroenterology.* 2006-09;131(3):934-45.
- [43] Polyzos SA, Kountouras J, Mantzoros CS. Adipokines in nonalcoholic fatty liver disease. *Metabolism.* 2016-08;65(8):1062-79.
- [44] Polyzos SA, Aronis KN, Kountouras J, Raptis DD, Vasiloglou MF, Mantzoros CS. Circulating leptin in non-alcoholic fatty liver disease: a systematic review and meta-analysis. *Diabetologia.* 2016-01;59(1):30-43.
- [45] Adolph TE, Grander C, Grabherr F, Tilg H. Adipokines and Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: Multiple Interactions. *Int J Mol Sci.* 2017-07-29;18(8):E1649.
- [46] Wu L, Chen G, Liu W, Yang X, Gao J, Huang L, et al. Intramuscular injection of exogenous leptin induces adiposity, glucose intolerance and fatty liver by repressing the JAK2-STAT3/PI3K pathway in a rat model. *Gen Comp Endocrinol.* 2017-10-01;252:88-96.
- [47] Khan RS, Bril F, Cusi K, Newsome PN. Modulation of Insulin Resistance in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Hepatology.* 2019-08;70(2):711-24.
- [48] Ahmadian M, Wang Y, Sul HS. Lipolysis in adipocytes. *Int J Biochem Cell Biol.* 2010-05;42(5):555-9.

- [49] Hossain IA, Akter S, Rahman MK, Ali L. Gender Specific Association of Serum Leptin and Insulinemic Indices with Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Prediabetic Subjects. *PLOS ONE*. 2015-11-16;10(11):e0142165.
- [50] Cernea S, Roiban AL, Both E, Huțanu A. Serum leptin and leptin resistance correlations with NAFLD in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Metab Res Rev*. 2018-11;34(8):e3050.
- [51] Wang J, Leclercq I, Brymora JM, Xu N, Ramezani-Moghadam M, London RM, et al. Kupffer cells mediate leptin-induced liver fibrosis. *Gastroenterology*. 2009-08;137(2):713-23.
- [52] Choi SS, Syn WK, Karaca GF, Omenetti A, Moylan CA, Witek RP, et al. Leptin promotes the myofibroblastic phenotype in hepatic stellate cells by activating the hedgehog pathway. *J Biol Chem*. 2010-11-19;285(47):36551-60.
- [53] Aleffi S, Navari N, Delogu W, Galastri S, Novo E, Rombouts K, et al. Mammalian target of rapamycin mediates the angiogenic effects of leptin in human hepatic stellate cells. 2011-08;301(2):G210-9.
- [54] Gregor MF, Hotamisligil GS. Thematic review series: Adipocyte Biology. Adipocyte stress: the endoplasmic reticulum and metabolic disease. *J Lipid Res*. 2007-09;48(9):1905-14.
- [55] Combs TP, Marliss EB. Adiponectin signaling in the liver. *Rev Endocr Metab Disord*. 2014-06;15(2):137-47.
- [56] Polyzos SA, Kountouras J, Zavos C, Tsiaousi E. The role of adiponectin in the pathogenesis and treatment of non-alcoholic fatty liver disease. 2010;12(5):365-83.
- [57] Adiels M, Olofsson SO, Taskinen MR, Borén J. Overproduction of Very Low-Density Lipoproteins Is the Hallmark of the Dyslipidemia in the Metabolic Syndrome;28(7):1225-36.
- [58] Hogue JC, Lamarche B, Tremblay AJ, Bergeron J, Gagné C, Couture P. Evidence of increased secretion of apolipoprotein B-48-containing lipoproteins in subjects with type 2 diabetes;48(6):1336-42.
- [59] Potts JL, Coppack SW, Fisher RM, Humphreys SM, Gibbons GF, Frayn KN. Impaired postprandial clearance of triacylglycerol-rich lipoproteins in adipose tissue in obese subjects;268(4):E588-94.
- [60] Semenkovich CF. Insulin resistance and atherosclerosis;116(7):1813-22.
- [61] Mitrou P, Boutati E, Lambadiari V, Maratou E, Komesidou V, Papakonstantinou A, et al. Rates of lipid fluxes in adipose tissue in vivo after a mixed meal in morbid obesity;34(4):770-4.
- [62] Sadur UN, Yost TJ, Eckel RH. Insulin Responsiveness of Adipose Tissue Lipoprotein Lipase Is Delayed but Preserved in Obesity;59(6):1176-82.
- [63] Bays H, Ballantyne C. Adiposopathy: why do adiposity and obesity cause metabolic disease?;1(4):389-420.
- [64] Hrnčir T, Hrnčířová L, Kverka M, Hromádka R, Machová V, Trčková E, et al. Gut Microbiota and NAFLD: Pathogenetic Mechanisms, Microbiota Signatures, and Therapeutic Interventions. *Microorganisms*. 2021-04-29;9(5):957.
- [65] Aron-Wisnewsky J, Vigliotti C, Witjes J, Le P, Holleboom AG, Verheij J, et al. Gut microbiota and human NAFLD: disentangling microbial signatures from metabolic disorders. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2020-05;17(5):279-97.
- [66] Eslam M, Valenti L, Romeo S. Genetics and epigenetics of NAFLD and NASH: Clinical impact. *J Hepatol*. 2018-02;68(2):268-79.
- [67] Eslam M, George J. Genetic and epigenetic mechanisms of NASH. *Hepatol Int*. 2016-05;10(3):394-406.
- [68] Eslam M, George J. Genetic contributions to NAFLD: leveraging shared genetics to uncover systems biology. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2020-01;17(1):40-52.

- [69] Metwally M, Bayoumi A, Romero-Gomez M, Thabet K, John M, Adams LA, et al. A polymorphism in the Irisin-encoding gene (FNDC5) associates with hepatic steatosis by differential miRNA binding to the 3'UTR. *J Hepatol*. 2019-03;70(3):494-500.
- [70] Bruce KD, Cagampang FR, Argenton M, Zhang J, Ethirajan PL, Burdge GC, et al. Maternal high-fat feeding primes steatohepatitis in adult mice offspring, involving mitochondrial dysfunction and altered lipogenesis gene expression. 2009;50(6):1796-808.
- [71] Stahl EP, Dhindsa DS, Lee SK, Sandesara PB, Chalasani NP, Sperling LS. Nonalcoholic Fatty Liver Disease and the Heart: JACC State-of-the-Art Review. *J Am Coll Cardiol*. 2019-03-01;73(8):948-63.
- [72] VanWagner LB, Wilcox JE, Colangelo LA, Lloyd-Jones DM, Carr JJ, Lima JA, et al. Association of nonalcoholic fatty liver disease with subclinical myocardial remodeling and dysfunction: A population-based study. *Hepatology*. 2015-09;62(3):773-83.
- [73] Jung JY, Park SK, Ryoo JH, Oh CM, Kang JG, Lee JH, et al. Effect of non-alcoholic fatty liver disease on left ventricular diastolic function and geometry in the Korean general population. *Hepatol Res*. 2017-05;47(6):522-32.
- [74] Lee YH, Kim KJ, Yoo ME, Kim G, Yoon HJ, Jo K, et al. Association of non-alcoholic steatohepatitis with subclinical myocardial dysfunction in non-cirrhotic patients. *J Hepatol*. 2018-04;68(4):764-72.
- [75] Hallsworth K, Hollingsworth KG, Thoma C, Jakovljevic D, MacGowan GA, Anstee QM, et al. Cardiac structure and function are altered in adults with non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol*. 2013-04;58(4):757-62.
- [76] Trovato FM, Martines GF, Catalano D, Musumeci G, Pirri C, Trovato GM. Echocardiography and NAFLD (non-alcoholic fatty liver disease). *Int J Cardiol*. 2016-10-15;221:275-9.
- [77] Anstee QM, Mantovani A, Tilg H, Targher G. Risk of cardiomyopathy and cardiac arrhythmias in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2018-07;15(7):425-39.
- [78] Markus MRP, Baumeister SE, Stritzke J, Dörr M, Wallaschofski H, Völzke H, et al. Hepatic steatosis is associated with aortic valve sclerosis in the general population: the Study of Health in Pomerania (SHIP). *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2013-07;33(7):1690-5.
- [79] Mantovani A, Pernigo M, Bergamini C, Bonapace S, Lipari P, Valbusa F, et al. Heart valve calcification in patients with type 2 diabetes and nonalcoholic fatty liver disease. *Metabolism*. 2015-08;64(8):879-87.
- [80] Targher G, Mantovani A, Pichiri I, Rigolon R, Dauriz M, Zoppini G, et al. Non-alcoholic fatty liver disease is associated with an increased prevalence of atrial fibrillation in hospitalized patients with type 2 diabetes. *Clin Sci (Lond)*. 2013-09;125(6):301-9.
- [81] Käräjämäki AJ, Pätsi OP, Savolainen M, Kesäniemi YA, Huikuri H, Ukkola O. Non-Alcoholic Fatty Liver Disease as a Predictor of Atrial Fibrillation in Middle-Aged Population (OPERA Study). *PLoS One*. 2015;10(11):e0142937.
- [82] Mangi MA, Minhas AM, Rehman H, Pathan F, Liang H, Beidas S. Association of Non-alcoholic Fatty Liver Disease with Conduction Defects on Electrocardiogram. *Cureus*. 2017-03-21;9(3):e1107.
- [83] Wijarnpreecha K, Panjawan P, Kroner PT, Cheungpasitporn W, Ungprasert P. Association between cardiac conduction defect and nonalcoholic fatty liver disease: a systematic review and meta-analysis. *Ann Gastroenterol*. 2020;33(6):661-6.
- [84] Savarese G, Lund LH. Global Public Health Burden of Heart Failure. *Card Fail Rev*. 2017-04;3(1):7-11.

- [85] Groenewegen A, Rutten FH, Mosterd A, Hoes AW. Epidemiology of heart failure. *Eur J Heart Fail.* 2020-08;22(8):1342-56.
- [86] Ye Q, Zou B, Yeo YH, Li J, Huang DQ, Wu Y, et al. Global prevalence, incidence, and outcomes of non-obese or lean non-alcoholic fatty liver disease: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Gastroenterol Hepatol.* 2020-08;5(8):739-52.
- [87] Sookoian S, Pirola CJ. Systematic review with meta-analysis: risk factors for non-alcoholic fatty liver disease suggest a shared altered metabolic and cardiovascular profile between lean and obese patients. *2017;46(2):85-95.*
- [88] Conjeevaram Selvakumar PK, Kabbany MN, Lopez R, Rayas MS, Lynch JL, Alkhoury N. Prevalence of Suspected Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Lean Adolescents in the United States. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2018-07;67(1):75-9.
- [89] Anderson EL, Howe LD, Jones HE, Higgins JPT, Lawlor DA, Fraser A. The Prevalence of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease in Children and Adolescents: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One.* 2015;10(10):e0140908.
- [90] Aneni EC, Bittencourt MS, Teng C, Cainzos-Achirica M, Osondu CU, Soliman A, et al. The risk of cardiometabolic disorders in lean non-alcoholic fatty liver disease: A longitudinal study. *Am J Prev Cardiol.* 2020-12;4:100097.
- [91] Wong VWS, Wong GLH, Chan RSM, Shu SST, Cheung BHK, Li LS, et al. Beneficial effects of lifestyle intervention in non-obese patients with non-alcoholic fatty liver disease;69(6):1349-56.
- [92] Cigrovski Berkovic M, Bilic-Curcic I, Mrzljak A, Cigrovski V. NAFLD and Physical Exercise: Ready, Steady, Go!;8:734859.
- [93] Leung JCF, Loong TCW, Wei JL, Wong GLH, Chan AWH, Choi PCL, et al. Histological severity and clinical outcomes of nonalcoholic fatty liver disease in nonobese patients. *Hepatology.* 2017-01;65(1):54-64.
- [94] Zou B, Yeo YH, Nguyen VH, Cheung R, Ingelsson E, Nguyen MH. Prevalence, characteristics and mortality outcomes of obese, nonobese and lean NAFLD in the United States, 1999-2016. *J Intern Med.* 2020-07;288(1):139-51.
- [95] Kumar R, Mohan S. Non-alcoholic Fatty Liver Disease in Lean Subjects: Characteristics and Implications. *J Clin Transl Hepatol.* 2017-09-28;5(3):216-23.
- [96] Barnett JL, Hasler WL, Camilleri M. American Gastroenterological Association medical position statement on anorectal testing techniques. American Gastroenterological Association. *Gastroenterology.* 1999-03;116(3):732-60.
- [97] Vilarinho S, Ajmera V, Zheng M, Loomba R. Emerging Role of Genomic Analysis in Clinical Evaluation of Lean Individuals With NAFLD. *Hepatology.* 2021-10;74(4):2241-50.
- [98] Conus F, Rabasa-Lhoret R, Péronnet F. Characteristics of metabolically obese normal-weight (MONW) subjects. *Appl Physiol Nutr Metab.* 2007-02;32(1):4-12.
- [99] Maier S, Wieland A, Cree-Green M, Nadeau K, Sullivan S, Lanaspa MA, et al. Lean NAFLD: an under-recognized and challenging disorder in medicine. *Rev Endocr Metab Disord.* 2021-06;22(2):351-66.
- [100] Krawczyk M, Bantel H, Rau M, Schattenberg JM, Grünhage F, Pathil A, et al. Could inherited predisposition drive non-obese fatty liver disease? Results from German tertiary referral centers. *J Hum Genet.* 2018-05;63(5):621-6.
- [101] Honda Y, Yoneda M, Kessoku T, Ogawa Y, Tomeno W, Imajo K, et al. Characteristics of non-obese non-alcoholic fatty liver disease: Effect of genetic and environmental factors. *2016;46(10):1011-8.*

- [102] Romeo S, Kozlitina J, Xing C, Pertsemlidis A, Cox D, Pennacchio LA, et al. Genetic variation in PNPLA3 confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Genet.* 2008-12;40(12):1461-5.
- [103] Sookoian S, Pirola CJ. Meta-analysis of the influence of I148M variant of patatin-like phospholipase domain containing 3 gene (PNPLA3) on the susceptibility and histological severity of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology.* 2011-06;53(6):1883-94.
- [104] Liu YL, Patman GL, Leathart JBS, Pigué AC, Burt AD, Dufour JF, et al. Carriage of the PNPLA3 rs738409 C >G polymorphism confers an increased risk of non-alcoholic fatty liver disease associated hepatocellular carcinoma. *J Hepatol.* 2014-07;61(1):75-81.
- [105] Stender S, Kozlitina J, Nordestgaard BG, Tybjaerg-Hansen A, Hobbs HH, Cohen JC. Adiposity amplifies the genetic risk of fatty liver disease conferred by multiple loci. *Nat Genet.* 2017-06;49(6):842-7.
- [106] Smagris E, BasuRay S, Li J, Huang Y, Lai KmV, Gromada J, et al. Pnpla3^{I148M} knockin mice accumulate PNPLA3 on lipid droplets and develop hepatic steatosis. *Hepatology.* 2015-01;61(1):108-18.
- [107] Dongiovanni P, Petta S, Maglio C, Fracanzani AL, Pipitone R, Mozzi E, et al. Transmembrane 6 superfamily member 2 gene variant disentangles nonalcoholic steatohepatitis from cardiovascular disease. *Hepatology.* 2015-02;61(2):506-14.
- [108] Chen VL, Chen Y, Du X, Handelman SK, Speliotes EK. Genetic variants that associate with cirrhosis have pleiotropic effects on human traits. 2020;40(2):405-15.
- [109] Smagris E, Gilyard S, BasuRay S, Cohen JC, Hobbs HH. Inactivation of Tm6sf2, a Gene Defective in Fatty Liver Disease, Impairs Lipidation but Not Secretion of Very Low Density Lipoproteins. *J Biol Chem.* 2016-05-13;291(20):10659-76.
- [110] Newberry EP, Hall Z, Xie Y, Molitor EA, Bayguinov PO, Strout GW, et al. Liver-Specific Deletion of Mouse Tm6sf2 Promotes Steatosis, Fibrosis, and Hepatocellular Cancer. *Hepatology.* 2021-09;74(3):1203-19.
- [111] Mancina RM, Dongiovanni P, Petta S, Pingitore P, Meroni M, Rametta R, et al. The MBOAT7-TMC4 Variant rs641738 Increases Risk of Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Individuals of European Descent. *Gastroenterology.* 2016-05;150(5):1219-30.e6.
- [112] Abul-Husn NS, Cheng X, Li AH, Xin Y, Schurmann C, Stevis P, et al. A Protein-Truncating HSD17B13 Variant and Protection from Chronic Liver Disease. *N Engl J Med.* 2018-03-22;378(12):1096-106.
- [113] Emdin CA, Haas ME, Khera AV, Aragam K, Chaffin M, Klarin D, et al. A missense variant in Mitochondrial Amidoxime Reducing Component 1 gene and protection against liver disease. *PLoS Genet.* 2020-04;16(4):e1008629.
- [114] Luukkonen PK, Juuti A, Sammalkorpi H, Penttilä AK, Orešič M, Hyötyläinen T, et al. MARC1 variant rs2642438 increases hepatic phosphatidylcholines and decreases severity of non-alcoholic fatty liver disease in humans. *J Hepatol.* 2020-09;73(3):725-6.
- [115] Young SG. Recent progress in understanding apolipoprotein B. *Circulation.* 1990-11;82(5):1574-94.
- [116] Youssefian L, Vahidnezhad H, Saeidian AH, Pajouhanfar S, Sotoudeh S, Mansouri P, et al. Inherited non-alcoholic fatty liver disease and dyslipidemia due to monoallelic ABHD5 mutations. *J Hepatol.* 2019-08;71(2):366-70.
- [117] Hoffman EP, Barr ML, Giovanni MA, Murray MF. Lysosomal Acid Lipase Deficiency. In: Adam MP, Everman DB, Mirzaa GM, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJ, et al., editors. *GeneReviews®*. University of Washington, Seattle; 1993. .

- [118] Garg A. Clinical review: Lipodystrophies: genetic and acquired body fat disorders. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011-11;96(11):3313-25.
- [119] Chiquette E, Oral EA, Garg A, Araújo-Vilar D, Dhankhar P. Estimating the prevalence of generalized and partial lipodystrophy: findings and challenges. *Diabetes Metab Syndr Obes.* 2017;10:375-83.
- [120] Kořínková L, Pražienková V, Černá L, Karnošová A, Železná B, Kuneš J, et al. Pathophysiology of NAFLD and NASH in Experimental Models: The Role of Food Intake Regulating Peptides. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2020;11:597583.
- [121] Van Herck MA, Vonghia L, Francque SM. Animal Models of Nonalcoholic Fatty Liver Disease-A Starter's Guide. *Nutrients.* 2017-09-27;9(10):E1072.
- [122] Ibrahim SH, Hirsova P, Malhi H, Gores GJ. Animal Models of Nonalcoholic Steatohepatitis: Eat, Delete, and Inflammation. *Dig Dis Sci.* 2016-05;61(5):1325-36.
- [123] Voet D, Voet JG, Domenjoud L. *Biochimie*. 3rd ed. De Boeck Supérieur; 2016. Available from: <http://catalogue.bnf.fr/ark:/12148/cb451506408>.
- [124] Aon MA, Stanley BA, Sivakumaran V, Kembro JM, O'Rourke B, Paolucci N, et al. Glutathione/thioredoxin systems modulate mitochondrial H₂O₂ emission: An experimental-computational study. *Journal of General Physiology.* 2012-05-14;139(6):479-91.
- [125] Westermann B. Mitochondrial fusion and fission in cell life and death. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2010-12;11(12):872-84.
- [126] Wai T, Langer T. Mitochondrial Dynamics and Metabolic Regulation. *Trends Endocrinol Metab.* 2016-02;27(2):105-17.
- [127] Galloway CA, Yoon Y. Mitochondrial morphology in metabolic diseases. *Antioxid Redox Signal.* 2013-08-01;19(4):415-30.
- [128] Liesa M, Shirihai OS. Mitochondrial dynamics in the regulation of nutrient utilization and energy expenditure. *Cell Metab.* 2013-04-02;17(4):491-506.
- [129] Zhang L, Zhang Y, Chang X, Zhang X. Imbalance in mitochondrial dynamics induced by low PGC-1 α expression contributes to hepatocyte EMT and liver fibrosis. *Cell Death & Disease.* 2020-04-01;11:226.
- [130] Krishnasamy Y, Gooz M, Li L, Lemasters JJ, Zhong Z. Role of mitochondrial depolarization and disrupted mitochondrial homeostasis in non-alcoholic steatohepatitis and fibrosis in mice. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol.* 2019;11(5):190-204.
- [131] Herst PM, Rowe MR, Carson GM, Berridge MV. Functional Mitochondria in Health and Disease. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2017;8:296.
- [132] Ploumi C, Daskalaki I, Tavernarakis N. Mitochondrial biogenesis and clearance: a balancing act. 2017;284(2):183-95.
- [133] Chan DC. Fusion and fission: interlinked processes critical for mitochondrial health. *Annu Rev Genet.* 2012;46:265-87.
- [134] Simões ICM, Fontes A, Pinton P, Zischka H, Wieckowski MR. Mitochondria in non-alcoholic fatty liver disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2018-02;95:93-9.
- [135] Legaki AI, Moustakas II, Sikorska M, Papadopoulos G, Velliou RI, Chatzigeorgiou A. Hepatocyte Mitochondrial Dynamics and Bioenergetics in Obesity-Related Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Curr Obes Rep.* 2022-09;11(3):126-43.
- [136] Sunny NE, Parks EJ, Browning JD, Burgess SC. Excessive hepatic mitochondrial TCA cycle and gluconeogenesis in humans with nonalcoholic fatty liver disease. *Cell Metab.* 2011-12-07;14(6):804-10.

- [137] Serviddio G, Bellanti F, Tamborra R, Rollo T, Capitanio N, Romano A, et al. Uncoupling protein-2 (UCP2) induces mitochondrial proton leak and increases susceptibility of non-alcoholic steatohepatitis (NASH) liver to ischaemia-reperfusion injury. *Gut*. 2008-08-01;57:957-65.
- [138] Lim CY, Jun DW, Jang SS, Cho WK, Chae JD, Jun JH. Effects of carnitine on peripheral blood mitochondrial DNA copy number and liver function in non-alcoholic fatty liver disease. *Korean J Gastroenterol*. 2010-06;55(6):384-9.
- [139] Jin X, Liu J, Chen YP, Xiang Z, Ding JX, Li YM. Effect of miR-146 targeted HDMCP up-regulation in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *PLoS One*. 2017;12(3):e0174218.
- [140] Koliaki C, Szendroedi J, Kaul K, Jelenik T, Nowotny P, Jankowiak F, et al. Adaptation of hepatic mitochondrial function in humans with non-alcoholic fatty liver is lost in steatohepatitis. *Cell Metab*. 2015-05-05;21(5):739-46.
- [141] De Mello AH, Costa AB, Engel JDG, Rezin GT. Mitochondrial dysfunction in obesity. *Life Sci*. 2018-01-01;192:26-32.
- [142] Teodoro JS, Rolo AP, Duarte FV, Simões AM, Palmeira CM. Differential alterations in mitochondrial function induced by a choline-deficient diet: understanding fatty liver disease progression. *Mitochondrion*. 2008-12;8(5):367-76.
- [143] 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. *Int J Mol Med*. 2007-09;20(3):351-8.
- [144] Huang YY, Gusdon AM, Qu S. Nonalcoholic fatty liver disease: molecular pathways and therapeutic strategies. *Lipids Health Dis*. 2013-11-09;12:171.
- [145] Carter-Kent C, Zein NN, Feldstein AE. Cytokines in the pathogenesis of fatty liver and disease progression to steatohepatitis: implications for treatment. *Am J Gastroenterol*. 2008-04;103(4):1036-42.
- [146] Rodrigues PM, Afonso MB, Simão AL, Carvalho CC, Trindade A, Duarte A, et al. miR-21 ablation and obeticholic acid ameliorate nonalcoholic steatohepatitis in mice. *Cell Death Dis*. 2017-04-13;8(4):e2748.
- [147] Lin YF, Haynes CM. Metabolism and the UPR(mt). *Mol Cell*. 2016-03-03;61(5):677-82.
- [148] Lee J, Homma T, Fujii J. Mice in the early stage of liver steatosis caused by a high fat diet are resistant to thioacetamide-induced hepatotoxicity and oxidative stress. *Toxicol Lett*. 2017-08-05;277:92-103.
- [149] Willy JA, Young SK, Stevens JL, Masuoka HC, Wek RC. CHOP links endoplasmic reticulum stress to NF- κ B activation in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Mol Biol Cell*. 2015-06-15;26(12):2190-204.
- [150] Aharoni-Simon M, Hann-Obercyger M, Pen S, Madar Z, Tirosh O. Fatty liver is associated with impaired activity of PPAR γ -coactivator 1 α (PGC1 α) and mitochondrial biogenesis in mice. *Lab Invest*. 2011-07;91(7):1018-28.
- [151] Di Ciaula A, Passarella S, Shanmugam H, Noviello M, Bonfrate L, Wang DQH, et al. Nonalcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD). Mitochondria as Players and Targets of Therapies? *Int J Mol Sci*. 2021-05-20;22(10):5375.
- [152] Cvitanovic Tomas T, Urlep Z, Moskon M, Mraz M, Rozman D. LiverSex Computational Model: Sexual Aspects in Hepatic Metabolism and Abnormalities. *Front Physiol*. 2018;9:360.
- [153] Wattacheril J, Sanyal AJ. Lean NAFLD: An Underrecognized Outlier. *Curr Hepatol Rep*. 2016-06;15(2):134-9.

- [154] Fried SK, Lee MJ, Karastergiou K. Shaping fat distribution: New insights into the molecular determinants of depot- and sex-dependent adipose biology. 2015;23(7):1345-52.
- [155] Tran TT, Kahn CR. Transplantation of adipose tissue and stem cells: role in metabolism and disease. *Nat Rev Endocrinol.* 2010-04;6(4):195-213.
- [156] Falony G, Joossens M, Vieira-Silva S, Wang J, Darzi Y, Faust K, et al. Population-level analysis of gut microbiome variation;352(6285):560-4.
- [157] Zhernakova A, Kurilshikov A, Bonder MJ, Tigchelaar EF, Schirmer M, Vatanen T, et al. Population-based metagenomics analysis reveals markers for gut microbiome composition and diversity;352(6285):565-9.
- [158] Sheng L, Jena PK, Liu HX, Kalanetra KM, Gonzalez FJ, French SW, et al. Gender Differences in Bile Acids and Microbiota in Relationship with Gender Dissimilarity in Steatosis Induced by Diet and FXR Inactivation;7:1748.
- [159] Adachi Y, Bradford BU, Gao W, Bojes HK, Thurman RG. Inactivation of Kupffer cells prevents early alcohol-induced liver injury;20(2):453-60.
- [160] Parlesak A, Schäfer C, Schütz T, Bode JC, Bode C. Increased intestinal permeability to macromolecules and endotoxemia in patients with chronic alcohol abuse in different stages of alcohol-induced liver disease;32(5):742-7.
- [161] Galli A, Pinaire J, Fischer M, Dorris R, Crabb DW. The transcriptional and DNA binding activity of peroxisome proliferator-activated receptor alpha is inhibited by ethanol metabolism. A novel mechanism for the development of ethanol-induced fatty liver;276(1):68-75.
- [162] You M, Fischer M, Deeg MA, Crabb DW. Ethanol induces fatty acid synthesis pathways by activation of sterol regulatory element-binding protein (SREBP);277(32):29342-7.
- [163] Frezza M, di Padova C, Pozzato G, Terpin M, Baraona E, Lieber CS. High blood alcohol levels in women. The role of decreased gastric alcohol dehydrogenase activity and first-pass metabolism;322(2):95-9.
- [164] Baraona E, Abittan CS, Dohmen K, Moretti M, Pozzato G, Chayes ZW, et al. Gender differences in pharmacokinetics of alcohol;25(4):502-7.
- [165] Ikejima K, Enomoto N, Iimuro Y, Ikejima A, Fang D, Xu J, et al. Estrogen increases sensitivity of hepatic Kupffer cells to endotoxin;274(4):G669-76.
- [166] Enomoto N, Yamashina S, Schemmer P, Rivera CA, Bradford BU, Enomoto A, et al. Estriol sensitizes rat Kupffer cells via gut-derived endotoxin;277(3):G671-7.
- [167] Marshall AW, Kingstone D, Boss M, Morgan MY. Ethanol elimination in males and females: relationship to menstrual cycle and body composition;3(5):701-6.
- [168] Arun J, Clements RH, Lazenby AJ, Leeth RR, Abrams GA. The Prevalence of Nonalcoholic Steatohepatitis is Greater in Morbidly Obese Men Compared to Women. *OBES SURG.* 2006-10-01;16(10):1351-8.
- [169] Skubic C, Drakulic Z, Rozman D. Personalized therapy when tackling nonalcoholic fatty liver disease: a focus on sex, genes, and drugs. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2018-08;14(8):831-41.
- [170] Lonardo A, Nascimbeni F, Ballestri S, Fairweather D, Win S, Than TA, et al. Sex Differences in Nonalcoholic Fatty Liver Disease: State of the Art and Identification of Research Gaps. *Hepatology.* 2019-10;70(4):1457-69.
- [171] Zhou Y, Shimizu I, Lu G, Itonaga M, Okamura Y, Shono M, et al. Hepatic stellate cells contain the functional estrogen receptor beta but not the estrogen receptor alpha in male and female rats. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001-09-07;286(5):1059-65.

- [172] Yasuda M, Shimizu I, Shiba M, Ito S. Suppressive effects of estradiol on dimethylnitrosamine-induced fibrosis of the liver in rats. 1999;29(3):719-27.
- [173] Buskiewicz IA, Huber SA, Fairweather D. Chapter 4 - Sex Hormone Receptor Expression in the Immune System. In: Neigh GN, Mitzelfelt MM, editors. Sex Differences in Physiology. Academic Press; 2016-01-01. p. 45-60.
- [174] Klein SL, Marriott I, Fish EN. Sex-based differences in immune function and responses to vaccination. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2015-01;109(1):9-15.
- [175] Naugler WE, Sakurai T, Kim S, Maeda S, Kim K, Elsharkawy AM, et al. Gender disparity in liver cancer due to sex differences in MyD88-dependent IL-6 production. *Science.* 2007-07-06;317(5834):121-4.
- [176] Tian GX, Sun Y, Pang CJ, Tan AH, Gao Y, Zhang HY, et al. Oestradiol is a protective factor for non-alcoholic fatty liver disease in healthy men. *Obes Rev.* 2012-04;13(4):381-7.
- [177] Cai MJ, Kong XN, Zhao XY. Influences of Gender and Age on the Prevalence and Complications of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao.* 2017-08-20;39(4):499-505.
- [178] Yang JD, Abdelmalek MF, Pang H, Guy CD, Smith AD, Diehl AM, et al. Gender and menopause impact severity of fibrosis among patients with nonalcoholic steatohepatitis. 2014;59(4):1406-14.
- [179] Klair JS, Yang JD, Abdelmalek MF, Guy CD, Gill RM, Yates K, et al. A longer duration of estrogen deficiency increases fibrosis risk among postmenopausal women with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology.* 2016-07;64(1):85-91.
- [180] Kurt Z, Barrere-Cain R, LaGuardia J, Mehrabian M, Pan C, Hui ST, et al. Tissue-specific pathways and networks underlying sexual dimorphism in non-alcoholic fatty liver disease. *Biol Sex Differ.* 2018-10-22;9(1):46.
- [181] Wu J, Yao XY, Shi RX, Liu SF, Wang XY. A potential link between polycystic ovary syndrome and non-alcoholic fatty liver disease: an update meta-analysis. *Reprod Health.* 2018-05-10;15(1):77.
- [182] Handelsman DJ, Sikaris K, Ly LP. Estimating age-specific trends in circulating testosterone and sex hormone-binding globulin in males and females across the lifespan. *Ann Clin Biochem.* 2016-05-01;53(3):377-84.
- [183] Vandell J, Dubois-Chevalier J, Gheeraert C, Derudas B, Raverdy V, Thuillier D, et al. Hepatic Molecular Signatures Highlight the Sexual Dimorphism of Nonalcoholic Steatohepatitis (NASH). *Hepatology.* 2021-03;73(3):920-36.
- [184] Xu C, Yu C, Ma H, Xu L, Miao M, Li Y. Prevalence and risk factors for the development of nonalcoholic fatty liver disease in a nonobese Chinese population: the Zhejiang Zhenhai Study. *Am J Gastroenterol.* 2013-08;108(8):1299-304.
- [185] Younossi ZM, Stepanova M, Negro F, Hallaji S, Younossi Y, Lam B, et al. Nonalcoholic fatty liver disease in lean individuals in the United States. *Medicine (Baltimore).* 2012-11;91(6):319-27.
- [186] Gouvernement du Canada IdresdC. Médecine personnalisée - IRSC; 2011-06-06. Available from: <https://cihr-irsc.gc.ca/f/43627.html>.
- [187] Pessayre D, Fromenty B. NASH: a mitochondrial disease. *J Hepatol.* 2005-06;42(6):928-40.
- [188] Sasarman F, Brunel-Guitton C, Antonicka H, Wai T, Shoubridge EA, LSFC Consortium. LRPPRC and SLIRP interact in a ribonucleoprotein complex that regulates posttranscriptional gene expression in mitochondria. *Mol Biol Cell.* 2010-04-15;21(8):1315-23.

- [189] Ruzzenente B, Metodiev MD, Wredenberg A, Bratic A, Park CB, Cámara Y, et al. LRPPRC is necessary for polyadenylation and coordination of translation of mitochondrial mRNAs. *EMBO J*. 2012-01-18;31(2):443-56.
- [190] Mootha VK, Lepage P, Miller K, Bunkenborg J, Reich M, Hjerrild M, et al. Identification of a gene causing human cytochrome c oxidase deficiency by integrative genomics. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003-01-21;100(2):605-10.
- [191] Cuillierier A, Honarmand S, Cadete VJJ, Ruiz M, Forest A, Deschênes S, et al. Loss of hepatic LRPPRC alters mitochondrial bioenergetics, regulation of permeability transition and trans-membrane ROS diffusion. *Hum Mol Genet*. 2017-08-15;26(16):3186-201.
- [192] Sasarman F, Nishimura T, Antonicka H, Weraarpachai W, Shoubridge EA, Allen B, et al. Tissue-specific responses to the LRPPRC founder mutation in French Canadian Leigh Syndrome. *Hum Mol Genet*. 2015-01-15;24(2):480-91.
- [193] Ruiz M, Cuillierier A, Daneault C, Deschênes S, Frayne IR, Bouchard B, et al. Lipidomics unveils lipid dyshomeostasis and low circulating plasmalogens as biomarkers in a monogenic mitochondrial disorder. *JCI Insight*. 2019-07-25;4(14):123231.
- [194] Malhotra P, Gill RK, Saksena S, Alrefai WA. Disturbances in Cholesterol Homeostasis and Non-alcoholic Fatty Liver Diseases. *Front Med (Lausanne)*. 2020;7:467.
- [195] Grefhorst A, Verkade HJ, Groen AK. The TICE Pathway: Mechanisms and Lipid-Lowering Therapies. *Methodist Debakey Cardiovasc J*. 2019-03;15(1):70-6.
- [196] Feng RN, Du SS, Wang C, Li YC, Liu LY, Guo FC, et al. Lean-non-alcoholic fatty liver disease increases risk for metabolic disorders in a normal weight Chinese population. *World J Gastroenterol*. 2014-12-21;20(47):17932-40.
- [197] Fujita K, Nozaki Y, Wada K, Yoneda M, Fujimoto Y, Fujitake M, et al. Dysfunctional very-low-density lipoprotein synthesis and release is a key factor in nonalcoholic steatohepatitis pathogenesis. *Hepatology*. 2009-09;50(3):772-80.
- [198] Charlton M, Sreekumar R, Rasmussen D, Lindor K, Nair KS. Apolipoprotein synthesis in nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*. 2002-04;35(4):898-904.
- [199] Yao ZM, Vance DE. The active synthesis of phosphatidylcholine is required for very low density lipoprotein secretion from rat hepatocytes. *Journal of Biological Chemistry*. 1988-02-25;263(6):2998-3004.
- [200] PubChem. ABCG8 - ATP binding cassette subfamily G member 8 (human);. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/gene/ABCG8/human>.
- [201] Taegtmeyer H. Metabolism—the lost child of cardiology. *J Am Coll Cardiol*. 2000-10;36(4):1386-8.
- [202] Goodwin GW, Taegtmeyer H. Improved energy homeostasis of the heart in the metabolic state of exercise. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2000-10;279(4):H1490-501.
- [203] Kaijser L, Berglund B. Myocardial lactate extraction and release at rest and during heavy exercise in healthy men. *Acta Physiol Scand*. 1992-01;144(1):39-45.
- [204] Wentz AE, d'Avignon DA, Weber ML, Cotter DG, Doherty JM, Kerns R, et al. Adaptation of myocardial substrate metabolism to a ketogenic nutrient environment. *J Biol Chem*. 2010-08-06;285(32):24447-56.
- [205] Balaban RS. Maintenance of the Metabolic Homeostasis of the Heart. 2006;1080(1):140-53.
- [206] Simonsen S, Kjekshus JK. The effect of free fatty acids on myocardial oxygen consumption during atrial pacing and catecholamine infusion in man. *Circulation*. 1978-09;58(3):484-91.

- [207] Goldberg IJ, Trent CM, Schulze PC. Lipid metabolism and toxicity in the heart. *Cell Metab.* 2012-06-06;15(6):805-12.
- [208] Wisneski JA, Gertz EW, Neese RA, Mayr M. Myocardial metabolism of free fatty acids. Studies with ¹⁴C-labeled substrates in humans. *J Clin Invest.* 1987-02;79(2):359-66.
- [209] Zimmer HG. Regulation of and intervention into the oxidative pentose phosphate pathway and adenine nucleotide metabolism in the heart. *Mol Cell Biochem.* 1996-08;160-161:101-9.
- [210] Goldberg IJ, Eckel RH, McPherson R. Triglycerides and heart disease: still a hypothesis? *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011-08;31(8):1716-25.
- [211] Bharadwaj KG, Hiyama Y, Hu Y, Huggins LA, Ramakrishnan R, Abumrad NA, et al. Chylomicron- and VLDL-derived lipids enter the heart through different pathways: in vivo evidence for receptor- and non-receptor-mediated fatty acid uptake. *J Biol Chem.* 2010-12-03;285(49):37976-86.
- [212] Pulawa LK, Eckel RH. Overexpression of muscle lipoprotein lipase and insulin sensitivity. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2002-09;5(5):569-74.
- [213] Shang R, Rodrigues B. Lipoprotein Lipase and Its Delivery of Fatty Acids to the Heart. *Biomolecules.* 2021-07-12;11(7):1016.
- [214] Noh HL, Okajima K, Molkentin JD, Homma S, Homma S, Goldberg IJ. Acute lipoprotein lipase deletion in adult mice leads to dyslipidemia and cardiac dysfunction. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2006-10;291(4):E755-60.
- [215] Augustus AS, Buchanan J, Park TS, Hirata K, Noh HL, Sun J, et al. Loss of lipoprotein lipase-derived fatty acids leads to increased cardiac glucose metabolism and heart dysfunction. *J Biol Chem.* 2006-03-31;281(13):8716-23.
- [216] Ghafourifar P, Klein SD, Schucht O, Schenk U, Pruschy M, Rocha S, et al. Ceramide induces cytochrome c release from isolated mitochondria. Importance of mitochondrial redox state. *J Biol Chem.* 1999-03-05;274(10):6080-4.
- [217] Itani SI, Ruderman NB, Schmieder F, Boden G. Lipid-induced insulin resistance in human muscle is associated with changes in diacylglycerol, protein kinase C, and I κ B- α . *Diabetes.* 2002-07;51(7):2005-11.
- [218] Holt HB, Wild SH, Postle AD, Zhang J, Koster G, Umpleby M, et al. Cortisol clearance and associations with insulin sensitivity, body fat and fatty liver in middle-aged men. *Diabetologia.* 2007-05;50(5):1024-32.
- [219] Paulmyer-Lacroix O, Boullu-Ciocca S, Oliver C, Dutour A, Grino M. Glucocorticoïdes, 11 β -hydroxystéroïde déshydrogénase de type 1 et obésité viscérale. *ms.* 2003;19(4):473-6.
- [220] Oláhová M, Hardy SA, Hall J, Yarham JW, Haack TB, Wilson WC, et al. LRPPRC mutations cause early-onset multisystem mitochondrial disease outside of the French-Canadian population. *Brain;*138:3503-19.
- [221] Kim SY. Diagnosis and Treatment of Hypopituitarism. *Endocrinol Metab (Seoul).* 2015-12;30(4):443-55.
- [222] Seeley RJ, MacDougald OA. Mice as experimental models for human physiology: when several degrees in housing temperature matter. *Nat Metab.* 2021-04;3(4):443-5.
- [223] Kasza I, Adler D, Nelson DW, Eric Yen CL, Dumas S, Ntambi JM, et al. Evaporative cooling provides a major metabolic energy sink. *Mol Metab.* 2019-09;27:47-61.
- [224] Giles DA, Moreno-Fernandez ME, Stankiewicz TE, Graspeuntner S, Cappelletti M, Wu D, et al. Thermoneutral housing exacerbates nonalcoholic fatty liver disease in mice and allows for sex-independent disease modeling. *Nat Med.* 2017-07;23(7):829-38.

- [225] Faraj M, Lu HL, Cianflone K. Diabetes, lipids, and adipocyte secretagogues. *Biochem Cell Biol.* 2004-02;82(1):170-90.
- [226] Long YC, Zierath JR. AMP-activated protein kinase signaling in metabolic regulation. *J Clin Invest.* 2006-07;116(7):1776-83.
- [227] Cahill GF. Fuel metabolism in starvation. *Annu Rev Nutr.* 2006;26:1-22.
- [228] Hanson R, Owen O. Gluconeogenesis. In: *Encyclopedia of Biological Chemistry*; 2013-12-31. p. 381-6.
- [229] Ramnanan CJ, Edgerton DS, Kraft G, Cherrington AD. Physiologic action of glucagon on liver glucose metabolism. *Diabetes Obes Metab.* 2011-10;13 Suppl 1:118-25.
- [230] Kawamori D, Kurpad AJ, Hu J, Liew CW, Shih JL, Ford EL, et al. Insulin signaling in alpha cells modulates glucagon secretion in vivo. *Cell Metab.* 2009-04;9(4):350-61.
- [231] Cooperberg BA, Cryer PE. Insulin reciprocally regulates glucagon secretion in humans;59(11):2936-40.
- [232] Kawamori R, Shichiri M, Kikuchi M, Yamasaki Y, Abe H. Perfect normalization of excessive glucagon responses to intravenous arginine in human diabetes mellitus with the artificial beta-cell. *Diabetes.* 1980-09;29(9):762-5.
- [233] Mitrakou A, Ryan C, Veneman T, Mokan M, Jenssen T, Kiss I, et al. Hierarchy of glycemic thresholds for counterregulatory hormone secretion, symptoms, and cerebral dysfunction. *Am J Physiol.* 1991-01;260(1):E67-74.
- [234] Sprague JE, Arbeláez AM. Glucose counterregulatory responses to hypoglycemia. *Pediatr Endocrinol Rev.* 2011-09;9(1):463-73; quiz 474-5.
- [235] Gautier JF, Choukem SP. Les incrétines. *Nutrition Clinique et Métabolisme.* 2008-06-01;22(2):59-65.
- [236] Voss TS, Vendelbo MH, Kampmann U, Hingst JR, Wojtaszewski JFP, Svart MV, et al. Acute Hypoglycemia in Healthy Humans Impairs Insulin-Stimulated Glucose Uptake and Glycogen Synthase in Skeletal Muscle: A Randomized Clinical Study. *Diabetes.* 2017-09;66(9):2483-94.
- [237] Lambillotte C, Gilon P, Henquin JC. Direct glucocorticoid inhibition of insulin secretion. An in vitro study of dexamethasone effects in mouse islets. *J Clin Invest.* 1997-02-01;99(3):414-23.
- [238] Tabatabaei Shafiei M, Carvajal Gonczi CM, Rahman MS, East A, François J, Darlington PJ. Detecting glycogen in peripheral blood mononuclear cells with periodic acid schiff staining. *J Vis Exp.* 2014-12-23;(94).
- [239] Du F, Ding Y, Zou J, Li Z, Tian J, She R, et al. Morphology and Molecular Mechanisms of Hepatic Injury in Rats under Simulated Weightlessness and the Protective Effects of Resistance Training. *PLoS One.* 2015;10(5):e0127047.
- [240] Harris R. Gluconeogenesis. In: *Reference Module in Life Sciences*; 2020-01-01. .
- [241] DeFronzo RA, Bonadonna RC, Ferrannini E. Pathogenesis of NIDDM. A balanced overview. *Diabetes Care.* 1992-03;15(3):318-68.
- [242] Stumvoll M, Goldstein BJ, van Haeften TW. Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy. *Lancet.* 2005-04-09;365(9467):1333-46.
- [243] Charron MJ, Gorovits N, Laidlaw JS, Ranalletta M, Katz EB. Use of Glut-4 Null Mice to Study Skeletal Muscle Glucose Uptake. 2005;32(4):308-13.
- [244] Hanpeter D, James DE. Characterization of the intracellular GLUT-4 compartment. *Mol Membr Biol.* 1995-09;12(3):263-9.

- [245] James DE, Piper RC, Slot JW. Insulin stimulation of GLUT-4 translocation: a model for regulated recycling. *Trends in Cell Biology*. 1994-04-01;4(4):120-6.
- [246] James DE, Piper RC. Insulin resistance, diabetes, and the insulin-regulated trafficking of GLUT-4. *J Cell Biol*. 1994-09;126(5):1123-6.
- [247] Neubauer S. The failing heart—an engine out of fuel. *N Engl J Med*. 2007-03-15;356(11):1140-51.
- [248] Depre C, Vanoverschelde JLJ, Taegtmeyer H. Glucose for the Heart. 1999-02-02;99(4):578-88.
- [249] Hue L, Taegtmeyer H. The Randle cycle revisited: a new head for an old hat. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2009-09;297(3):E578-91.
- [250] Randle PJ. Regulatory interactions between lipids and carbohydrates: the glucose fatty acid cycle after 35 years. 1998;14(4):263-83.
- [251] Randle PJ, Garland PB, Hales CN, Newsholme EA. The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. *Lancet*. 1963-04-13;1(7285):785-9.
- [252] Seferović PM, Paulus WJ. Clinical diabetic cardiomyopathy: a two-faced disease with restrictive and dilated phenotypes. *European Heart Journal*. 2015-07-14;36(27):1718-27.
- [253] Girard J. [Contribution of free fatty acids to impairment of insulin secretion and action: mechanism of beta-cell lipotoxicity]. *Med Sci (Paris)*. 2003-09;19(8):827-33.
- [254] Roden M, Price TB, Perseghin G, Petersen KF, Rothman DL, Cline GW, et al. Mechanism of free fatty acid-induced insulin resistance in humans. *J Clin Invest*. 1996-06-15;97(12):2859-65.
- [255] Dresner A, Laurent D, Marcucci M, Griffin ME, Dufour S, Cline GW, et al. Effects of free fatty acids on glucose transport and IRS-1-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity. *J Clin Invest*. 1999-01;103(2):253-9.
- [256] Yilmaz S, Canpolat U, Aydogdu S, Abboud HE. Diabetic Cardiomyopathy; Summary of 41 Years. *Korean Circ J*. 2015-07;45(4):266-72.
- [257] Couchepin C, Lê KA, Bortolotti M, da Encarnação JA, Oboni JB, Tran C, et al. Markedly blunted metabolic effects of fructose in healthy young female subjects compared with male subjects. *Diabetes Care*. 2008-06;31(6):1254-6.
- [258] Ter Horst KW, Gilijamse PW, de Weijer BA, Kilicarslan M, Ackermans MT, Nederveen AJ, et al. Sexual Dimorphism in Hepatic, Adipose Tissue, and Peripheral Tissue Insulin Sensitivity in Obese Humans. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2015;6:182.
- [259] Tramunt B, Smati S, Grandgeorge N, Lenfant F, Arnal JF, Montagner A, et al. Sex differences in metabolic regulation and diabetes susceptibility. *Diabetologia*. 2020-03;63(3):453-61.
- [260] Grossmann M, Wierman ME, Angus P, Handelsman DJ. Reproductive Endocrinology of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Endocr Rev*. 2019-04-01;40(2):417-46.
- [261] Shen M, Shi H. Sex Hormones and Their Receptors Regulate Liver Energy Homeostasis. *Int J Endocrinol*. 2015;2015:294278.
- [262] Della Torre S, Benedusi V, Fontana R, Maggi A. Energy metabolism and fertility: a balance preserved for female health. *Nat Rev Endocrinol*. 2014-01;10(1):13-23.
- [263] Gutierrez-Grobe Y, Ponciano-Rodríguez G, Ramos MH, Uribe M, Méndez-Sánchez N. Prevalence of non alcoholic fatty liver disease in premenopausal, postmenopausal and polycystic ovary syndrome women. *Annals of Hepatology*. 2010-10-01;9(4):402-9.
- [264] Knowlton AA, Lee AR. Estrogen and the cardiovascular system. *Pharmacol Ther*. 2012-07;135(1):54-70.

- [265] Villa A, Della Torre S, Stell A, Cook J, Brown M, Maggi A. Tetradian oscillation of estrogen receptor α is necessary to prevent liver lipid deposition. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012-07-17;109(29):11806-11.
- [266] D'Eon TM, Souza SC, Aronovitz M, Obin MS, Fried SK, Greenberg AS. Estrogen regulation of adiposity and fuel partitioning. Evidence of genomic and non-genomic regulation of lipogenic and oxidative pathways. *J Biol Chem*. 2005-10-28;280(43):35983-91.
- [267] Zhu L, Brown WC, Cai Q, Krust A, Chambon P, McGuinness OP, et al. Estrogen treatment after ovariectomy protects against fatty liver and may improve pathway-selective insulin resistance. *Diabetes*. 2013-02;62(2):424-34.
- [268] Yan H, Yang W, Zhou F, Li X, Pan Q, Shen Z, et al. Estrogen Improves Insulin Sensitivity and Suppresses Gluconeogenesis via the Transcription Factor Foxo1. *Diabetes*. 2019-02;68(2):291-304.
- [269] Paquette A, Wang D, Jankowski M, Gutkowska J, Lavoie JM. Effects of ovariectomy on PPAR alpha, SREBP-1c, and SCD-1 gene expression in the rat liver. *Menopause*. 2008-12;15(6):1169-75.
- [270] Palmisano BT, Zhu L, Stafford JM. Role of Estrogens in the Regulation of Liver Lipid Metabolism. *Adv Exp Med Biol*. 2017;1043:227-56.
- [271] Barsalani R, Chapados NA, Lavoie JM. Hepatic VLDL-TG production and MTP gene expression are decreased in ovariectomized rats: effects of exercise training. *Horm Metab Res*. 2010-11;42(12):860-7.
- [272] Della Torre S. Non-alcoholic Fatty Liver Disease as a Canonical Example of Metabolic Inflammatory-Based Liver Disease Showing a Sex-Specific Prevalence: Relevance of Estrogen Signaling. 2020;11.
- [273] Toda K, Toda A, Ono M, Saibara T. Lack of 17β -estradiol reduces sensitivity to insulin in the liver and muscle of male mice. *Heliyon*. 2018-09;4(9):e00772.
- [274] Van Sinderen ML, Steinberg GR, Jørgensen SB, To SQ, Knowler KC, Clyne CD, et al. Hepatic glucose intolerance precedes hepatic steatosis in the male aromatase knockout (ArKO) mouse. *PLoS One*. 2014;9(2):e87230.
- [275] Maffei L, Rochira V, Zirilli L, Antunez P, Aranda C, Fabre B, et al. A novel compound heterozygous mutation of the aromatase gene in an adult man: reinforced evidence on the relationship between congenital oestrogen deficiency, adiposity and the metabolic syndrome. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2007-08;67(2):218-24.
- [276] Chen Z, Wang O, Nie M, Alison K, Zhou D, Li M, et al. Aromatase deficiency in a Chinese adult man caused by novel compound heterozygous CYP19A1 mutations: effects of estrogen replacement therapy on the bone, lipid, liver and glucose metabolism. *Mol Cell Endocrinol*. 2015-01-05;399:32-42.
- [277] Jones ME, Thorburn AW, Britt KL, Hewitt KN, Wreford NG, Proietto J, et al. Aromatase-deficient (ArKO) mice have a phenotype of increased adiposity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000-11-07;97(23):12735-40.
- [278] Amano A, Kondo Y, Noda Y, Ohta M, Kawanishi N, Machida S, et al. Abnormal lipid/lipoprotein metabolism and high plasma testosterone levels in male but not female aromatase-knockout mice. *Arch Biochem Biophys*. 2017-05-15;622:47-58.
- [279] Nemoto Y, Toda K, Ono M, Fujikawa-Adachi K, Saibara T, Onishi S, et al. Altered expression of fatty acid-metabolizing enzymes in aromatase-deficient mice. *J Clin Invest*. 2000-06;105(12):1819-25.

- [280] Bryzgalova G, Gao H, Ahren B, Zierath JR, Galuska D, Steiler TL, et al. Evidence that oestrogen receptor- α plays an important role in the regulation of glucose homeostasis in mice: insulin sensitivity in the liver. *Diabetologia*. 2006-03;49(3):588-97.
- [281] Barros RPA, Gustafsson JA. Estrogen receptors and the metabolic network. *Cell Metab*. 2011-09-07;14(3):289-99.
- [282] Heine PA, Taylor JA, Iwamoto GA, Lubahn DB, Cooke PS. Increased adipose tissue in male and female estrogen receptor- α knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000-11-07;97(23):12729-34.
- [283] Ramirez MC, Bourguignon NS, Bonaventura MM, Lux-Lantos V, Libertun C, Becu-Villalobos D. Neonatal xenoestrogen exposure alters growth hormone-dependent liver proteins and genes in adult female rats. *Toxicol Lett*. 2012-09-18;213(3):325-31.
- [284] Watanabe K, Fujii H, Takahashi T, Kodama M, Aizawa Y, Ohta Y, et al. Constitutive regulation of cardiac fatty acid metabolism through peroxisome proliferator-activated receptor α associated with age-dependent cardiac toxicity. *J Biol Chem*. 2000-07-21;275(29):22293-9.
- [285] Meinhardt UJ, Ho KKY. Modulation of growth hormone action by sex steroids. 2006;65(4):413-22.
- [286] Sugathan A, Waxman DJ. Genome-Wide Analysis of Chromatin States Reveals Distinct Mechanisms of Sex-Dependent Gene Regulation in Male and Female Mouse Liver. 2013-09-15;33(18):3594-610.
- [287] Zheng D, Wang X, Antonson P, Gustafsson JA, Li Z. Genomics of sex hormone receptor signaling in hepatic sexual dimorphism. *Mol Cell Endocrinol*. 2018-08-15;471:33-41.
- [288] van Nas A, Guhathakurta D, Wang SS, Yehya N, Horvath S, Zhang B, et al. Elucidating the role of gonadal hormones in sexually dimorphic gene coexpression networks. *Endocrinology*. 2009-03;150(3):1235-49.
- [289] Dowman JK, Hopkins LJ, Reynolds GM, Armstrong MJ, Nasiri M, Nikolaou N, et al. Loss of 5 α -reductase type 1 accelerates the development of hepatic steatosis but protects against hepatocellular carcinoma in male mice. *Endocrinology*. 2013-12;154(12):4536-47.
- [290] Biddie SC. Chromatin architecture and the regulation of nuclear receptor inducible transcription. *J Neuroendocrinol*. 2011-01;23(1):94-106.
- [291] Paik SG, Michelis MA, Kim YT, Shin S. Induction of insulin-dependent diabetes by streptozotocin. Inhibition by estrogens and potentiation by androgens. *Diabetes*. 1982-08;31(8):724-9.
- [292] Christenson ES, Jaffee E, Azad NS. Current and emerging therapies for patients with advanced pancreatic ductal adenocarcinoma: a bright future. *Lancet Oncol*. 2020-03;21(3):e135-45.
- [293] Kaur H, Werstuck GH. The Effect of Testosterone on Cardiovascular Disease and Cardiovascular Risk Factors in Men: A Review of Clinical and Preclinical Data. *CJC Open*. 2021-10;3(10):1238-48.
- [294] Jones TH, Kelly DM. Randomized controlled trials - mechanistic studies of testosterone and the cardiovascular system. *Asian J Androl*. 2018-04;20(2):120-30.
- [295] Lichanska AM, Waters MJ. How growth hormone controls growth, obesity and sexual dimorphism. *Trends Genet*. 2008-01;24(1):41-7.
- [296] Waxman DJ, O'Connor C. Growth hormone regulation of sex-dependent liver gene expression. *Mol Endocrinol*. 2006-11;20(11):2613-29.
- [297] Roy AK, Chatterjee B. Sexual dimorphism in the liver. *Annu Rev Physiol*. 1983;45:37-50.
- [298] Mode A, Gustafsson JA. Sex and the liver - a journey through five decades. *Drug Metab Rev*. 2006;38(1):197-207.