

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

CARACTÉRISATION DES MÉCANISMES DE RÉGULATION MÉTABOLIQUE
ET INFLAMMATOIRE EXTRA-CÉRÉBRAUX DE L'APOLIPOPROTÉINE D

THÈSE
PRÉSENTÉE
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DU DOCTORAT EN BIOLOGIE

PAR
FRÉDÉRIK DESMARAIS

JUILLET 2021

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de cette thèse se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.04-2020). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

REMERCIEMENTS

C'est avec beaucoup de fierté et d'émotion que je vous présente le fruit de mes années d'étude au doctorat. Le chemin pour se rendre jusqu'à ce point ne fut pas de tout repos. Les embûches et les désagréments furent nombreux, mais c'est grâce à la persévérance et au soutien de mes proches, de mes mentors et de mes collègues que je suis en mesure de présenter ce document aujourd'hui. Ce soutien, j'en suis évidemment grandement reconnaissant. C'est pour cela que je tiens à remercier, ici, ces personnes et leur importance dans l'accomplissement de ma thèse.

Tout d'abord, je tiens à remercier ma directrice Catherine Mounier Ph.D. et mon codirecteur de recherche Éric Rassart Ph.D. d'avoir pris une chance avec moi. Je dois reconnaître la grande évolution et la maturation scientifique dont j'ai bénéficié depuis mon recrutement dans leurs équipes. Cette croissance personnelle, je la dois en bonne partie à leur encadrement et à l'environnement de travail qu'ils m'ont apporté. Je tiens également à remercier Karl-F Bergeron Ph.D., l'associé de recherche de Catherine. J'aimerais pouvoir dire que je suis mon propre plus grand critique, mais cette place revient probablement plus à Karl. Que ce soit dans les détails expérimentaux ou la rédaction d'articles ou de demandes de subvention, Karl a toujours su révéler les petites failles et me pousser à améliorer la qualité de mon travail. Cela m'a amené à être, moi-même, plus critique de mon travail et celui des autres. Je tiens donc à le remercier pour son rôle dans mon développement professionnel.

Je dois également remercier mes collègues Amine Lounis, Sabri Rial, Simon Lalonde, Marine Lingrand, Gaëtan Ravaut, Alexandre Légiot, Antoine Jutras-Carignan pour leur support au cours des années. C'est également grâce à leur camaraderie et leur esprit

d'équipe que j'ai pu passer à travers les moments les plus dures. L'époque où nous allions jouer aux cartes en prenant un café en fin de journée (toute relative quand l'on sait les heures un peu loufoques auxquelles on pouvait finir de travailler) restera à jamais chère à mon cœur. Puisse nos amitiés durer à jamais. Je considérerai toujours notre équipe comme une seconde famille et je vous souhaite à tous de merveilleuses vies et une incroyable carrière.

Aussi, je tiens à remercier le travail des stagiaires dont j'ai eu la chance d'encadrer. À vous; Yuli Ruiz, Nadine Savy, Catherine Vallée, Manon Tisserant, Doriane Gisquet, Annabelle Boudy, Audrey Girardeau et Guillaume Desmarais-Fyfe, j'espère avoir su vous encadrer et avoir permis de vous développer dans le monde de la recherche en sciences biologiques. Je vous souhaite de merveilleuses carrières. À Guillaume qui va prendre le flambeau de mes projets, je lui souhaite la meilleure des chances.

Enfin, je tiens à remercier mes parents Denis, Isabelle et Alain ainsi que mes frères Guillaume (pas le même Guillaume Desmarais qu'au paragraphe précédent) et Simon pour leur soutien. Ils ont su s'intéresser à mes recherches et m'épauler dans ce processus. Mes frères se sont même efforcés d'apprendre à prononcer et retenir le terme « Apolipoprotéine D » pour pouvoir en discuter avec moi. Enfin, je tiens à remercier ma conjointe, Julie. Sa présence calme, rassurante et encourageante a été d'une aide immesurable. Ce, particulièrement dans les dernières lignes droites alors que le stress se montrait omniprésent et amplifié par le contexte de la pandémie SARS-CoV-2.

À toutes ces personnes, je tiens à leur témoigner tous mes remerciements. C'est à eux que je dédie cet ouvrage.

À tous mes proches qui m'ont permis de me
rendre jusqu'ici.

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES.....	x
LISTE DES TABLEAUX.....	xiii
LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES	xiv
Liste des symboles et des unités	xxi
RÉSUMÉ	xxii
INTRODUCTION	1
CHAPITRE I État des connaissances	4
1.1 Introduction et caractéristiques de l'Apolipoprotéine D (ApoD).....	4
1.1.1 Le gène <i>ApoD</i>	6
1.1.2 La structure protéique de l'ApoD	7
1.1.3 Les ligands de l'ApoD	9
1.1.4 L'expression de l'ApoD.....	18
1.1.5 Influence des voies métaboliques.....	24
1.1.6 Souris Tg(THY1-APOD1)1Era (ou hApoD).....	28
1.1.7 Métabolisme de l'acide arachidonique.....	30
1.1.8 Pertinence de l'accumulation d'ARA dans le foie des souris	42
1.2 L'obésité	43
1.3 Stéatose hépatique non alcoolique.....	47
1.4 PPAR γ , CD36 et l'emballement prolipogénique.....	50
1.5 SREBP-1s et interactions avec l'ARA.	52
1.6 Cytokines et polarisation M1/M2 dans un contexte hépatique.....	54
1.7 Les barrières du SNC.....	57
1.8 Drainage lymphatique du cerveau	61

1.9	La basigine (CD147).....	66
1.10	Objectifs et hypothèses	68

CHAPITRE II DES HAUT NIVEAUX PROTÉIQUES D’APOD DANS LE DÉPÔT ADIPEUX DU LIGAMENT ROND EST ASSOCIÉ AVEC UN MEILLEUR PROFIL MÉTABOLIQUE CHEZ LES FEMMES SÉVÈREMENT OBÈSES.....		73
--	--	----

2.1	Avant-Propos	74
2.2	Résumé	76
2.3	Abstract.....	77
2.4	Introduction.....	78
2.5	Materials and methods.....	80
2.5.1	Patient selection	80
2.5.2	Anthropometric measurements and blood sampling.....	81
2.5.3	Adipose tissue removal	81
2.5.4	Immunoblotting.....	82
2.5.5	Statistical analyses	83
2.6	Results	83
2.7	Conclusion	85
2.8	Acknowledgements.....	88
2.9	Conflict of interest	89
2.10	Figure legends.....	89

CHAPITRE III LA SUREXPRESSIION DE L’APOLIPOPROTÉINE D ALTÈRE LES MÉTABOLISMES HÉPATIQUES DES ACIDES GRAS OMÉGA ET DES PROSTAGLANDINES LORS DU DÉVELOPPEMENT D’UNE STÉATOSE HÉPATIQUE NON-INFLAMMATOIRE.....		99
---	--	----

3.1	Avant-propos	100
3.2	Résumé	103
3.3	Abstract.....	104
3.4	Introduction.....	105
3.5	Meterial and methods	106
3.5.1	Animals	106

3.5.2	RNA extraction and quantitative PCR	107
3.5.3	Immunoblotting.....	108
3.5.4	Enzyme-linked immunosorbent assays	109
3.5.5	Histology.....	109
3.5.6	Fatty acid profiling.....	110
3.5.7	Statistics	110
3.6	Results	111
3.6.1	Hepatic lipid accumulation is apparent at 9 months of age	111
3.6.2	Lipid uptake increases at 6 months	111
3.6.3	Anti-inflammatory profile at 6 months	112
3.6.4	Overproduction of prostaglandin D2 and 15d-PGJ2.....	113
3.6.5	Omega fatty acid accumulation during aging	113
3.7	Discussion.....	114
3.8	Acknowledgements.....	118
3.9	Figure legends.....	118
CHAPITRE IV L'APOLIPOPROTÉINE D CÉRÉBRALE S'ÉCHAPPE DU CERVEAU ET S'ACCUMULE DANS LES TISSUS périphériques.....		133
4.1	Avant-propos	134
4.2	Résumé	137
4.3	Abstract.....	139
4.4	Introduction.....	140
4.5	Material and methods	143
4.5.1	Animals	143
4.5.2	Protein radiolabeling.....	143
4.5.3	Intracerebroventricular and intravascular injections.....	143
4.5.4	Tissue and fluids sample preparation.....	144
4.5.5	Cell culture.....	146
4.5.6	Immunofluorescence.....	148
4.5.7	Immunoblotting.....	148
4.5.8	Statistics	149
4.6	Results	149
4.6.1	hApoD exits the central nervous system and reaches peripheral tissues 149	
4.6.2	hApoD accumulates in specific tissues.....	150
4.6.3	hApoD transcytoses through bEnd.3 brain endothelial barrier cells.....	152

4.6.4	Cyclophilin A competition does not reduce hApoD internalisation in brain endothelial barrier cells	152
4.6.5	Relationship between BSG glycosylation and hApoD accumulation...	153
4.7	Discussion.....	154
4.8	Acknowledgements.....	163
4.9	Figure legends.....	163
CHAPITRE V Conclusion et perspectives		177
5.1	Conclusion	178
5.2	Perspectives	186
5.2.1	Étude de l'influence du degré de glycosylation sur l'interaction ApoD-BSG	186
5.2.2	Influence de BSG sur la sortie de l'ApoD du cerveau et son accumulation dans les tissus périphériques	193
5.2.3	Influence de BSG sur l'accumulation adipeuse de l'ApoD chez l'humain	198
5.2.4	Investigation du transport neuro-hépatique d'acides gras médié par l'ApoD	199
5.2.5	Étude d'affinité de l'ApoD pour les oméga-3	201
5.2.6	Impact métaboliques et comportementaux de l'ApoD dans l'obésité. .	203
5.2.7	Synthèse des perspectives	207
ANNEXE A LES MÉDIATEURS LIPIDIQUES ET L'INFLAMMASOME		209
ANNEXE B Apolipoprotéine D		253
BIBLIOGRAPHIE		283

LISTE DES FIGURES

Figure	Page
1.1 Structure de l'ApoD humaine complexée à la progestérone	9
1.2 Expression relative de l'ApoD en ARNm et en protéine dans les tissus chez plusieurs espèces.....	19
1.3 Métabolisme de l'acide arachidonique : de l'acide linoléique aux eicosanoïdes.....	32
1.4 Voie de synthèse des prostanoïdes	36
1.5 Voie de synthèse des leucotriènes	38
1.6 Voies de synthèses de lipoxines	40
1.7 Schématisation des barrières du SNC humain.....	58
1.8 Drainage du CSF dans le sinus sagittal supérieur et le système veineux. ...	60
1.9 Circulation du CSF et système glymphatique	61
1.10 Sélectivité et fonctions complémentaires des systèmes de drainage lymphatiques du cerveau	62
1.11 Révélation immunohistochimique de la BSG sur une biopsie hépatique humaine.....	64
2.1 ApoD protein levels amongst adipose tissues of each individual.....	87

2.2	Metabolic profiles associated with ApoD protein level	88
2.3	Metabolic profiles associated with body mass index	89
S.2.1	Division of the cohort into high versus low ApoD protein expression in various fat depots.....	90
3.1	ApoD overexpression increases hepatic lipid accumulation	116
3.2	Steatosis in hApoD mice is linked to PPAR γ activation starting at 6months.	117
3.3	Hepatic inflammatory polarization in hApoD mice	118
3.4	Hepatic production of anti-inflammatory 15d-PGJ2 in 6-month-old hApoD mice.....	119
3.5	ApoD overexpression modulates omega acid hepatic content at 12 months.	120
3.6	Model of inflammation control during the development of hepatic steatosis in hApoD mice.....	121
3.7	Cellular model for hepatic production of 15d-PGJ2 in response to ApoD overexpression	122
S.3.1	Preliminary qPCR array panel	123
S.3.2	Additional lipids included in the GC-MS panel	124
S.3.3	Effect of age on hepatic lipid accumulation and composition.....	125
4.1	hApoD injected in the brain accumulates in urine and liver	160
4.2	Circulating hApoD accumulates in specific metabolic organs.....	161
4.3	Relative accumulation of hApoD in fluids and tissues.....	162

4.4	hApoD is subject to endocytosis and transcytosis through bEnd.3 cells.....	163
4.5	Cyclophilin A competition does not reduce hApoD internalisation in bEnd.3 cells.....	164
4.6	hApoD tends to accumulate in tissues expressing underglycosylated Basigin.....	165
S.4.1	Protein integrity after radiolabelling.....	166
S.4.2	Transendothelial electrical resistance (TEER) of bEnd.3 cells after seeding	167
S.4.3	HEPES circulation protocol validation.....	168
5.1	Séquences de la BSG.....	181
5.2	Mutagenèses ponctuelles sur le gène BSG	182
5.3	Relation entre diamètre et densité des lipoprotéines	188
5.4	Principe de séparation des microvésicules extracellulaire par séparation acousto-fluidique	189
5.5	Représentation schématique du système SPR	193
A.1.1	NLRP3 inflammasome priming and activation	212
A.1.2	Lipid mediator biosynthetic pathways.....	213

LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Page
1.1 Molécules testées comme potentiels ligands d'ApoD et leur Ka	12-17
2.1 Physical and metabolic characteristics of severely obese women.....	91
2.2 Correlation coefficients between ApoD levels (mRNA and protein) in various fat depots and patient metabolic characteristics.....	92
5.1 Composition cérébrale en acide gras ces souris WT et hApoD	175

LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES

5-LOX	<i>5-Lipoxygenase</i>
12-LOX	<i>12-Lipoxygenase</i>
15d-PGJ ₂	<i>15-Deoxy-Delta-12-14-prostaglandin J2</i>
15-LOX	<i>15-Lipoxygenase</i>
ARA	Acide Arachidonique
AIM2	Interferon-inducible protein AIM2 (absent in melanoma 2)
Akt1	<i>RAC-alpha serine/threonine-protein kinase</i>
ALA	<i>alpha-Linolenic fatty acid</i>
ApoA-I	Apolipoprotéine A-I
ApoA-II	Apolipoprotéine A-II
ApoB-48	Apolipoprotéine B-48
ApoB-100	Apolipoprotéine B-100
ApoC-I	Apolipoprotéine C-I
ApoC-II	Apolipoprotéine C-II
ApoD	Apolipoprotéine D
ApoE	Apolipoprotéine E
AP1	<i>Activator protein 1</i>
APP	<i>Acute phase proteins</i>
ASC	<i>Apoptosis-associated speck-like protein containing CARD</i>
AT	<i>Adipose tissue</i>
ATP	<i>Adenosine triphosphate</i>
AVC	Accident vasculaire cérébral

BMI	<i>Body mass index</i>
BLT ₁	<i>Leukotriene B₄ receptor 1</i>
CARD	<i>C-terminal caspase recruitment domain</i>
COX-1	<i>Cyclooxygenase-1</i>
COX-2	<i>Cyclooxygenase-2</i>
CaMK	<i>Calcium/calmodulin-dependent protein kinase</i>
cAMP	<i>Cyclic adenosine monophosphate</i>
CCL5	<i>Chemokine (C-C motif) ligand 5</i>
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
cPLA ₂	<i>Cytosolic Phospholipase A₂</i>
CpPG	<i>Cyclopentenone prostaglandin</i>
CNS	<i>Central nervous system</i>
CXCL1	<i>C-X-C motif chemokine ligand 1</i>
CXCL10	<i>C-X-C motif chemokine ligand 10</i>
DAMP	<i>Danger-associated molecular pattern</i>
DHA	<i>Docosahexaenoic acid</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
Elovl5	<i>Elongation of very long chain fatty acids protein 5</i>
EMSA	<i>Electronic mobility shift assay</i>
EP1	<i>Prostaglandin E₂ receptor 1</i>
EP2	<i>Prostaglandin E₂ receptor 2</i>
EP3	<i>Prostaglandin E₂ receptor 3</i>
EP4	<i>Prostaglandin E₂ receptor 4</i>
EPA	<i>Eicosapentaenoic acid</i>
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i>
Fads1	<i>Fatty acid desaturase 1</i>
Fads2	<i>Fatty acid desaturase 2</i>
FAME	<i>Fatty acid methyl derivatives</i>

FASN	<i>Fatty acid synthase</i>
<i>Fat-1</i>	<i>Omega-3 fatty acid desaturase fat-1</i>
GLUT4	<i>Glucose transporter type 4</i>
GPCR	<i>G protein-coupled receptors</i>
HDL	<i>High density lipoprotein</i>
HETE	<i>Hydroxyeicosatetraenoic acids</i>
HFD	<i>High fat diet</i>
HOMA	<i>Homeostasis model assessment</i>
HPGDS	<i>Hematopoietic prostaglandin D synthase</i>
I κ B α	<i>Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha</i>
IKK	<i>IκB kinase</i>
IL-1 β	<i>Interleukine 1-β</i>
IL-1Ra	<i>Interleukin-1 receptors antagonists</i>
IL-4	<i>Interleukine 4</i>
IL-6	<i>Interleukine-6</i>
IL-10	<i>Interleukine 10</i>
IL-18	<i>Interleukine 18</i>
IP	<i>Prostaglandin I2 receptor</i>
IR	<i>Insulin resistance</i>
IRS-1	<i>Insulin receptor substrate 1</i>
IRS-2	<i>Insulin receptor substrate 2</i>
JNK	<i>c-Jun NH2-terminal Kinase</i>
Ka	<i>Constante d'association</i>
KLF4	<i>Krüppel-like factor 4</i>
LA	<i>Linoleic acid</i>
γ -LA	<i>γ-Linoleic acid</i>
Laz	<i>Lazarillo</i>

LCAT	<i>Lecithin cholesterol acyltransferase</i>
LCFA	<i>Long chain fatty acid</i>
LDL	<i>Low density lipoprotein</i>
L-PGDS	<i>Lipocalin-type prostaglandin D synthase</i>
LPL	<i>Lipoprotein lipase</i>
LPS	<i>Lipopolysaccharides</i>
LTB ₄	<i>Leukotriene A₄</i>
LTB ₄	<i>Leukotriene B₄</i>
LTC ₄	<i>Leukotriene C₄</i>
LXA ₄	<i>Lipoxin A₄</i>
LXB ₄	<i>Lipoxin B₄</i>
LXR	<i>Liver X receptor</i>
MaR1	<i>Maresin 1</i>
MaR2	<i>Maresin 2</i>
MCFA	<i>Medium chain fatty acid</i>
MCP-1	<i>Monocyte chemoattractant protein 1</i>
MCTR	<i>Maresin Conjugates in Tissue Regeneration</i>
MCTR1	<i>Maresin Conjugates in Tissue Regeneration 1</i>
ME	<i>Mesenteric adipose tissue</i>
mPGES-1	<i>Microsomal prostaglandin E synthase-1</i>
mPGES-2	<i>Microsomal prostaglandin E synthase-2</i>
n-3 DPA	<i>Docosapentaenoic acid</i>
NASH	<i>Non-alcoholic steatohepatitis</i>
NEK7	<i>NIMA (never in mitosis gene a) Related Kinase 7</i>
NLaz	<i>Neural Lazarillo</i>
NLRC4	<i>NLR family CARD domain-containing protein 4</i>
NLRP1	<i>NLR family pyrin domain containing 1</i>
NLRP3	<i>NLR family pyrin domain containing 3</i>

NF- κ B	<i>Nuclear factor kappa B</i>
OM	<i>Omental adipose tissue</i>
OPN	<i>Ostéopontine</i>
P2X7	<i>P2X purinoceptor 7</i>
PAI-1	<i>Plasminogen activator inhibitor-1</i>
PAMP	<i>Pathogen-associated molecular pattern</i>
PC	<i>Phosphatidylcholine</i>
PCTR	<i>Protectin Conjugates in Tissue Regeneration</i>
PD1	<i>Protectin D1</i>
PDX	<i>Protectin DX</i>
PE	<i>Phosphatidyléthanolamine</i>
PGA ₂	<i>Prostaglandin A₂</i>
PGB ₂	<i>Prostaglandin B₂</i>
PGC ₂	<i>Prostaglandin C₂</i>
PGD ₂	<i>Prostaglandin D₂</i>
PGE ₂	<i>Prostaglandin E₂</i>
PGF _{2α}	<i>Prostaglandin F_{2α}</i>
PGG ₂	<i>Prostaglandin G₂</i>
PGH ₂	<i>Prostaglandin H₂</i>
PGI ₂	<i>Prostaglandin I₂</i>
PGIS	<i>Prostaglandin I Synthase</i>
PI	<i>Phosphatidylinositol</i>
PPAR β/δ	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor β/δ</i>
PPAR γ	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor gamma</i>
PPR	<i>Patern-regognition receptor</i>
PUFA	<i>Polyunsaturated fatty acid</i>
QUICKI	<i>Quantitative insulin check index</i>
RAR	<i>Retinoic acid nuclear receptors</i>

RANKL	<i>Receptor activator of nuclear factor-κB ligand</i>
RCTR	<i>Resolvin Conjugates in Tissue Regenerations</i>
RelA/p65	<i>Nuclear factor NF-kappa-B p65 subunit</i>
RL	<i>Round ligament adipose tissue</i>
ROR α	<i>RAR-related orphan receptor alpha</i>
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
RvD1	<i>Resolvin D1</i>
RvD1	<i>Resolvin D2</i>
SCD1	<i>Stearoyl CoA desaturase 1</i>
SCFA	<i>Short chain fatty acid</i>
sEV	<i>Small extracellular vesicles</i>
SNC	<i>Système nerveux central</i>
SPM	<i>Specialized proresolving mediator</i>
SRE	<i>Serum responsive element</i>
SREBP-1	<i>Sterol regulatory element-binding protein 1</i>
T2D	<i>Type 2 diabetes</i>
TAG	<i>Triacylglycerol</i>
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TGF- β 1	<i>Transforming growth factor beta 1</i>
Thy1	<i>Thymocyte differentiation antigen 1</i>
TNF- α	<i>Tumor necrosis factor-α</i>
TXA ₂	<i>Thromboxane A2</i>
TXNIP	<i>Thioredoxin-interacting protein</i>
UCP1	<i>Uncoupling protein 1</i>
WAT	<i>White adipose tissue</i>
WT	<i>Wild type</i>

LISTE DES SYMBOLES ET DES UNITÉS

%	Pourcentage
μ -, m-, L	micro-, mili-, litre
μ -, m-, M	micro-, mili-, molaire
°C	Degré Celcius (ou degrés centigrades)
h	Heure
kDa	Kilodalton
M	Molarité
min	Minutes
n	Échantillon statistique
n-, μ -, k-, g	Nano-, micro-, kilo-, gramme
n-, μ -, m-, m	Nano-, micro-, mili-, mètre
pH	Potentiel hydrogène (acidité)
s	Secondes
v	Volume

RÉSUMÉ

La lipocaline apolipoprotéine D (ApoD) a pour principale fonction le transport de petits ligands hydrophobes et la réduction des lipides peroxydés. Par la nature de son ligand préférentiel, l'acide arachidonique, et sa fonction catalytique, l'ApoD est une protéine aux effets anti-inflammatoires et antioxydants. L'acide arachidonique est d'ailleurs un acide gras toxique en faible concentration et abondamment libéré des membranes cellulaires lors des dommages neuronaux. Le haut niveau d'expression de l'ApoD en réponse aux dommages neurologiques et son habilité à séquestrer l'acide arachidonique, lui a valu un grand intérêt dans le contexte des maladies neurodégénératives. Toutefois, des évidences récentes indiquent que l'ApoD pourrait avoir un impact important sur plusieurs organes aux fonctions métaboliques importantes, en particulier dans le foie. Les souris transgéniques âgées (12 mois) surexprimant l'ApoD humaine dans leur cerveau, sous l'influence du promoteur du gène Thy1, développent une importante stéatose hépatique sans toutefois démontrer l'inflammation caractéristique à ce stade d'accumulation lipidique et cela malgré une accumulation plus importante d'acide arachidonique. Considérant les fonctions connues de l'ApoD, ce développement n'était pas entièrement étonnant et indiquait que la surexpression d'ApoD puisse engendrer un afflux ou une rétention d'acide arachidonique dans le foie et mener à des déséquilibres dans la production des eicosanoïdes. Ces données nous ont menés à trois grandes questions. Les niveaux d'expression d'ApoD sont-ils corrélés à un meilleur profil métabolique et inflammatoire chez les individus obèses? Quelles sont les causes et la série d'événements métaboliques responsables du développement d'une stéatose non inflammatoire en réponse à la surexpression soutenue d'ApoD dans le cerveau? L'ApoD est-elle effectivement capable de quitter efficacement le système nerveux central (SNC), potentiellement par un transport actif, pour atteindre les organes métaboliques tels que le foie? Pour répondre à ces questions, une étude sur différents types de tissus adipeux ainsi que sur des paramètres métaboliques obtenus sur une cohorte de femmes présentant une obésité morbide a été menée. À cela s'est ajoutée la caractérisation moléculaire de la progression de la stéatose hépatique des souris transgéniques. Enfin, la biodistribution de l'ApoD cérébrale a été déterminée via l'injection intracérébroventriculaire puis intravasculaire d'apolipoprotéine D radiomarquée chez des souris C57BL/6J. Nos résultats indiquent que l'expression de l'ApoD, en particulier au niveau protéique dans le tissu adipeux du ligament rond, est associée à une meilleure sensibilité à l'insuline et à un niveau réduit des marqueurs de

l'inflammation systémique (TNF- α) et de la thrombose (PAI-1). Nos données chez la souris indiquent que l'ApoD module substantiellement la composition lipidique hépatique en maintenant tout au long du vieillissement une proportion bénéfique d'acides gras polyinsaturés/ acides gras saturés et mono-insaturés en plus de promouvoir un meilleur ratio oméga-3/oméga-6 que celui des souris sauvages. De plus, la production de prostaglandines est altérée chez les souris transgéniques favorisant ainsi la synthèse des prostaglandines anti-inflammatoires PGD₂ et 15d-PGJ₂ dès l'âge de 6 mois. Le pic de production initial de 15d-PGJ₂, un puissant agoniste de PPAR γ , est d'ailleurs l'événement initial menant à la rapide accumulation lipidique qui devient évidente dans les mois suivants. Cette étude a également permis de constater que le foie ne dégénère pas vers un statut pro-inflammatoire et que contre-intuitivement le type d'acides gras préférentiellement accumulés dans l'organe pourrait même mener à un meilleur bilan inflammatoire que les souris de type sauvage et cela au cours du vieillissement. Cela mènerait une amélioration de la santé métabolique malgré la résistance à l'insuline présente chez les souris transgéniques. Enfin, les études d'injections d'ApoD radiomarquée ont permis de démontrer que l'ApoD quitte rapidement le cerveau pour atteindre de multiples organes périphériques tels que le foie, le muscle, le pancréas, l'intestin, la rate et le tissu adipeux mésentérique, sans toutefois retourner au cerveau. De manière surprenante, l'ApoD atteignait même les reins pour ensuite aller s'accumuler dans l'urine. Additionnellement, le taux d'accumulation spécifique d'ApoD dans les tissus est corrélé au niveau d'expression de la forme sous-glycosylée du récepteur basigine (BSG). Or, la BSG est le récepteur permettant l'internalisation de l'ApoD dans les neurones et donc possiblement également dans d'autres types cellulaires. Ensemble, ces résultats indiquent que l'ApoD pourrait être impliquée dans un mécanisme de transport neuro-hépatique des acides gras délétères relâchés lors des dommages neurologiques et révèle un rôle important de l'ApoD dans le métabolisme lipidique et inflammatoire périphérique.

Mots clés : Apolipoprotéine D, métabolisme, inflammation, transport lipidique

INTRODUCTION

L'Alzheimer (Alzheimer's Disease, AD) est la maladie neurodégénérative la plus répandue dans le monde. En 2013, elle représentait 50 à 70% des cas de démence chez les personnes âgées de 65 ans et plus. Aux États-Unis seulement, les coûts de traitements de cette maladie étaient de 203 milliards de dollars américains (Alzheimer's, 2013). Une part importante des coûts liés à l'AD vient du fait qu'il s'agit d'une maladie incurable dont les seuls traitements consistent à soulager les symptômes. De nombreuses équipes de recherche tentent donc de développer des traitements permettant de ralentir ou même de stopper la progression de la maladie (Folch et al., 2015). Or, il a été démontré que l'Apolipoprotéine D (ApoD) est une protéine neurale neuroprotectrice qui pourrait servir d'outil thérapeutique afin de ralentir le développement de la pathologie. Lors de la caractérisation de son fonctionnement chez l'animal, la souche de souris transgénique Tg(THY1-APOD1)¹Era a été créée afin de surexprimer l'ApoD humaine (hApoD) dans le système nerveux central (SNC), plus spécifiquement dans les neurones. Toutefois, ses autres fonctions dans le métabolisme des lipides laissent des doutes quant aux bienfaits de cette utilisation.

Cependant, les souris hApoD développent une stéatose hépatique 12 mois après leur naissance (Do Carmo, Fournier, Mounier, & Rassart, 2009; Labrie et al., 2015). Le développement de cette pathologie étant un frein majeur à l'utilisation de l'ApoD comme cible thérapeutique, il est primordial de comprendre et, si possible, d'empêcher son développement si elle représente un danger réel pour la santé des patients. L'apparition de cette pathologie au niveau du foie est d'autant plus surprenante que l'ApoD est surexprimée dans le SNC de ces souris. Les barrières du SNC devraient en

principe séquestrer l'ApoD dans ce compartiment, mais il semble que l'ApoD arrive tout de même à atteindre le foie. Cela évoque la possibilité de mécanismes physiologiques dirigeant l'ApoD vers le foie. Ces données évoquent également la possibilité d'un mécanisme de sortie de la protéine par transcytose à travers ces barrières. Le développement d'une stéatose hépatique chez la souris hApoD suggère que l'ApoD est plus impliquée dans le métabolisme des lipides qu'on ne le pensait initialement. Il est donc raisonnable de se questionner sur l'impact de l'ApoD dans d'autres pathologies associées au métabolisme, tout particulièrement dans l'obésité, une maladie qui affecte une proportion encore plus grande de la population que l'AD avec une prévalence mondiale de 600 millions d'individus affectés (Ng et al., 2014). Fait surprenant, bien que les souris hApoD développent une stéatose hépatique, elles ne présentent pas l'inflammation chronique qui est normalement associée à ces niveaux d'accumulation lipidique (Bechmann et al., 2012; Do Carmo, Fournier, et al., 2009). Au contraire, les concentrations plasmatiques en cytokines des animaux transgéniques sont en partie même inférieures à celles des souris WT du même âge (Do Carmo, Fournier, et al., 2009). Ce résultat contre-intuitif indique donc que l'ApoD pourrait avoir un rôle complexe, mais étrangement bénéfique sur le profil métabolique et suggère un rôle potentiel d'ApoD sur le contrôle de l'inflammation métabolique. L'ApoD est déjà connue dans le cerveau pour exercer des fonctions anti-inflammatoires. En sachant cela, les travaux menés au cours de la production de cette thèse de doctorat se sont attelés à répondre à trois grandes questions, soit :

1. Les niveaux d'expression d'ApoD sont-ils corrélés à un meilleur profil métabolique et inflammatoire chez les individus obèses?
2. Quelles sont les causes et la série d'événements métaboliques responsables du développement d'une stéatose non inflammatoire en réponse à la surexpression soutenue d'ApoD dans le cerveau?

3. L'ApoD est-elle effectivement capable de quitter efficacement le SNC, potentiellement par un transport actif, pour atteindre les organes métaboliques tels que le foie?

Ces questions ont donc été explorées en détail et le résultat de ces investigations sont exposés dans les chapitres II à IV.

CHAPITRE I

ÉTAT DES CONNAISSANCES

1.1 Introduction et caractéristiques de l'Apolipoprotéine D (ApoD)

L'ApoD est une glycoprotéine d'environ 29 kDa. Elle fut détectée pour la première fois en 1963 comme composante du système des lipoprotéines dans le plasma humain (Ayrault-Jarrier, Levy, Wald, & Polonovski, 1963). Elle fut ensuite partiellement caractérisée en 1976 (McConathy & Alaupovic, 1976). La séquence d'acide aminé composant l'ApoD fut ensuite déduite à grâce au cDNA cloné à partir de l'ADN humain (D. Drayna et al., 1986). Cela permit de révéler que l'ApoD a un haut degré d'homologie avec la superfamille des lipocalines, une famille de protéines dont la fonction est de transporter de petits ligands hydrophobes. Il est important, ici, de souligner la différence entre les apolipoprotéines et les lipocalines. Les apolipoprotéines possèdent généralement des régions hélicoïdales amphipathiques (Oram & Heinecke, 2007) et sont soit des protéines structurelles grâce auxquelles les lipoprotéines sont constituées ou soit des protéines facilitant les fonctions des lipoprotéines. Les lipoprotéines sont des structures sphériques possédant une surface hydrophobe polaire grâce à l'assemblage d'une monocouche de phospholipides dont la tête polaire fait face au milieu extracellulaire. La queue non polaire de ces mêmes phospholipides crée un environnement hydrophobe au cœur des lipoprotéines dans lequel viennent s'insérer d'autres lipides (triglycérides et cholestérol) également

hydrophobes (Ramasamy, 2014). Cet arrangement permet le transport de grandes quantités de molécules hydrophobes dans la circulation sanguine. Quant à elles, les lipocalines sont de petites protéines solubles comprenant un barillet bêta à huit brins liés par des ponts d'hydrogène leur permettant de lier et transporter un ligand à la fois (Flower, 1996).

Les apolipoprotéines comme l'ApoA-I, A-II, B-48 et B-100 servent de squelette permettant la formation de la structure sphérique des lipoprotéines. L'ApoB-100 et l'ApoE servent de ligands pour le récepteur des lipoprotéines de basse densité (*Low density lipoprotein receptor*, LDLR) et d'autres apolipoprotéines tel que l'ApoA-I, A-II, C-I et C-II permettent l'interaction d'enzymes avec les lipoprotéines (Ramasamy, 2014). À ce jour, le rôle de l'ApoD au sein du système des lipoprotéines n'est pas encore clair. La majeure partie de l'ApoD associée aux lipoprotéines se retrouve à la surface des lipoprotéines de haute densité (*High density lipoprotein*, HDL) où elle assisterait au fonctionnement de certaines enzymes (Perdomo et al., 2010) (voir détails plus bas). Cependant, l'ApoD n'est pas toujours liée aux lipoprotéines. Elle est également retrouvée libre (Camato, Marcel, Milne, Lussier-Cacan, & Weech, 1989) ou dans des vésicules extracellulaires (Pascua-Maestro et al., 2018). Une dernière différence majeure avec les autres apolipoprotéines est que l'ApoD n'est pas ou peu produite dans le foie et les intestins (Rassart, Desmarais, Najyb, Bergeron, & Mounier, 2020), mais possède de multiples différentes fonctions dans un grand éventail d'autres tissus (D. Drayna et al., 1986; P. R. Provost, Weech, Tremblay, Marcel, & Rassart, 1990; Rassart et al., 2020; Séguin, Desforges, & Rassart, 1995; K. M. Smith, Lawn, & Wilcox, 1990). Cet ensemble de différences fait en sorte que l'ApoD est considérée comme une apolipoprotéine atypique et est régulièrement omise des articles de révision scientifique portant sur les apolipoprotéines. Pour souligner cette différence, de nombreux articles utilisent l'appellation de la « lipocaline ApoD » puisque la compréhension des fonctions de l'ApoD est plus facile sous l'optique de son

appartenance à cette famille plutôt qu'à celle des apolipoprotéines. Une autre caractéristique intéressante de l'ApoD est sa grande versatilité face aux molécules qu'elle peut lier. Un grand éventail de ligands a été identifié pour l'ApoD (Rassart et al., 2020) (Tableau 1.1). Cette caractéristique et le fait qu'elle soit exprimée dans de nombreux tissus et dans de nombreux contextes portent à croire que l'ApoD serait une protéine multifonctionnelle.

1.1.1 Le gène *ApoD*

Le gène *ApoD* est situé sur le chromosome 3 chez l'humain (D. T. Drayna et al., 1987) et sur le chromosome 16 chez la souris (Warden, Anh, Taylor, & Lusis, 1992). Ces deux espèces seront les modèles qui nous intéresseront dans le contexte des recherches effectuées pour cette thèse. Chez l'humain, la région du promoteur du gène *ApoD* contient de nombreux éléments de régulation. Parmi ceux-ci, on retrouve des éléments de réponse aux stéroïdes, œstrogènes, progestérones, et glucocorticoïdes (Lambert, Provost, Marcel, & Rassart, 1993). On retrouve également des éléments de réponse aux acides gras, le *liver X receptor* (LXR) (Hummasti et al., 2004), ainsi qu'un élément de réponse aux *Nuclear Factor kappa B* (NF-κB), *Activator protein 1* (AP-1) et aux *Acute phase proteins* (APP) (Do Carmo, Levros, & Rassart, 2007), des facteurs de transcription majeure impliqués dans l'inflammation. Finalement, on y retrouve une paire de *serum responsive éléments* (SRE) activés lors de l'arrêt de croissance des cellules (Do Carmo, Seguin, Milne, & Rassart, 2002). Il va sans dire que la présence d'un si grand nombre d'éléments régulateurs dans le promoteur du gène de l'ApoD signifie que la régulation de son expression est importante et sans doute particulièrement complexe.

1.1.2 La structure protéique de l'ApoD

La séquence d'acide aminé et la structure de l'ApoD sont hautement conservées chez les mammifères. Par exemple, la protéine humaine partage un degré d'identité de 87.3% avec celle du singe rhésus, 79.3% avec le lapin, 73.1% avec la souris et le rat (Rassart et al., 2020). En fait, l'ApoD serait la plus ancienne lipocaline au niveau évolutif. On retrouve donc des homologues d'ApoD chez les insectes comme la *Neural Lazarillo* (NLaz) chez *Drosophila melanogaster* (31.3% d'identité) et la Lazarillo (Laz) chez la sauterelle *Schistocerca american* (26.0% d'identité) (Dassati, Waldner, & Schweigreiter, 2014; Ruiz, Sanchez, Correnti, Strong, & Ganfornina, 2013). On retrouve également des analogues de l'ApoD chez les plantes (Frenette Charron, Breton, Badawi, & Sarhan, 2002) et la bactérie (Bishop, Penfold, Frost, Holtje, & Weiner, 1995). L'ApoD est composée de 169 résidus incluant un peptide de sécrétion de 20 acides aminés. Elle possède également deux sites de N-glycosylation aux asparagines 45 et 78 (Schindler, Settineri, Collet, Fielding, & Burlingame, 1995). Ensemble, ces glycosylations augmentent grandement la masse moléculaire de la protéine. De plus, le niveau de glycosylation de la protéine est hautement variable et dépend de la cellule sécrétrice. L'ApoD cérébrale, par exemple, est hypoglycosylée comparativement à l'ApoD périphérique (H. Li, Ruberu, Karl, & Garner, 2016). Pour cette raison, il est possible de retrouver l'ApoD de 20 à 32 kDa, avec une masse moyenne d'environ 29 kDa (Rassart et al., 2000; Weech et al., 1991). Il a été suggéré que cette différence de glycosylation pourrait influencer l'activité de l'ApoD et dicter sa fonction dans divers tissus (H. Li et al., 2016). Une telle influence de la glycosylation sur l'activité protéique a déjà été montrée avec d'autres protéines. Par exemple la perte de la glycosylation au niveau de l'Asparagine 272 convertit la *lécithine-cholestérol acyltransferase* (LCAT) en phospholipase générant des acides gras plutôt que des esters de cholestérol (Francone, Evangelista, & Fielding, 1993).

Tel que mentionné précédemment, la structure tertiaire de l'ApoD comprend une cavité hydrophobe composée de 8 feuillets bêta antiparallèles capables d'accommoder de multiples ligands (Eichinger, Nasreen, Kim, & Skerra, 2007; Peitsch & Boguski, 1990). Une autre particularité de l'ApoD qui la distingue des autres lipocalines est la présence de trois saillies hydrophobes localisées à proximité de l'entrée de cette cavité (Figure 1.1). Ces projections sembleraient s'imbriquer dans la phase lipidique des HDL et possiblement sur d'autres lipoprotéines et même sur des cellules. Ce sont ces sites qui permettraient à l'ApoD de s'arrimer à la surface des HDL (Eichinger et al., 2007). La dernière particularité de l'ApoD est la présence de cinq cystéines dont quatre forment des ponts disulfures au sein même de la protéine. Cependant, la cinquième cystéine, la cystéine-116, présente uniquement dans la forme humaine, est libre et permet de former des liens disulfures avec d'autres protéines. Cela inclut l'homodimérisation avec une autre molécule d'ApoD (Bhatia et al., 2013), mais également l'hétérodimérisation avec d'autres protéines inclut l'ApoA-I, l'ApoA-II et la LCAT (Blanco-Vaca, Via, Yang, Massey, & Pownall, 1992; Fielding & Fielding, 1980; Weech et al., 1991; C. Y. Yang et al., 1994). Des homodimères d'ApoD ont été observés dans le cerveau, lors de stress oxydatifs (Bhatia et al., 2013), dans l'urine (Blanco-Vaca & Pownall, 1993) et dans les larmes (Holzfeind, Merschak, Dieplinger, & Redl, 1995). Un homotétramère d'ApoD a également été observé dans le fluide kystique mammaire où il serait la principale forme présente (Kielkopf et al., 2018). Les prédictions informatiques indiquent que ces homodimères seraient formés via l'assemblage, face-à-face, de deux dimères d'ApoD. Une configuration où toutes les poches hydrophobes des quatre particules d'ApoD seraient inaccessibles aux ligands (Kielkopf et al., 2018).

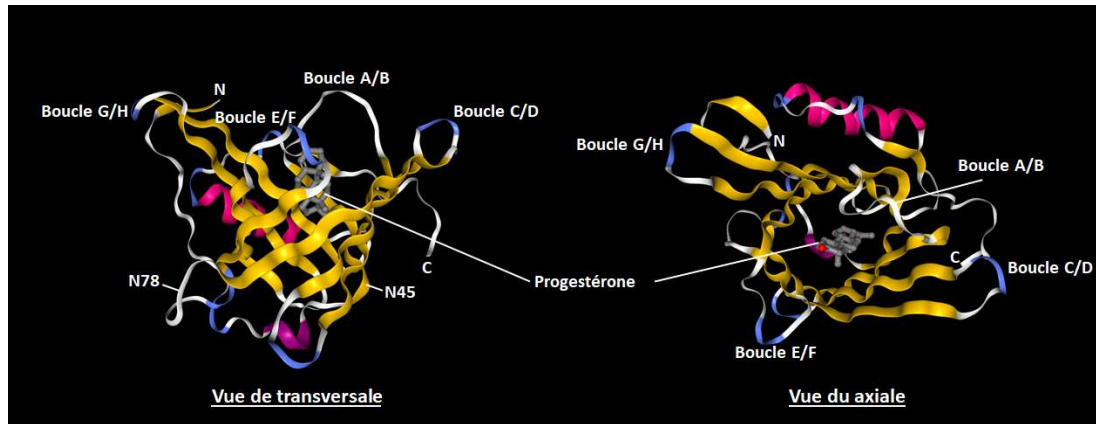


Figure 1.1 : Structure de l'ApoD humaine complexée à la progestérone (modifiée de Rassart E *et al.* 2020). À gauche : la vue transversale montrant les huit feuilletts bêta antiparallèles (jaune) formant la cavité hydrophobe caractéristique des lipocalines. Les boucles A/B, C/D, E/F et G/H lient les feuilletts bêta du côté ouvert de la cavité de liaison. D'autres boucles sont présentes sous la cavité (blanc). Il y a deux hélices alpha (mauve) présentes en bordure de la cavité, dont l'une peut boucher l'orifice. Les deux sites de glycosylation (N45 et N78) sont pointés. Les deux ponts disulfures ne sont pas représentés. À droite : la vue axiale montre l'orifice de cavité de liaison où réside la progestérone (gris). Les boucles A/B, E/F et G/H sont riches en résidus hydrophobes et sont très probablement impliqués dans l'association de l'ApoD aux HDL et aux membranes cellulaires.

1.1.3 Les ligands de l'ApoD

Les prochaines sections détailleront les divers ligands ayant été découverts pour l'ApoD. Pour des fins de clarté, chaque mention de l'ApoD dans ces sections fera référence à la forme humaine de la protéine (hApoD) puisque c'est uniquement sous cette forme que l'ApoD a été étudiée chez les mammifères dans les études d'association. Dans les cas pertinents, les homologues d'ApoD chez les invertébrés (NLaz et Laz) seront également discutés.

1.1.3.1 Acide arachidonique

L'acide arachidonique (AA) est le ligand connu pour avoir la plus forte affinité pour l'ApoD avec une constante d'association (K_a) de $1.62 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ (Morais Cabral et al., 1995) (Tableau 1.1). L'ARA est un acide gras polyinsaturé (*polyunsaturated fatty acid*, PUFA) de type oméga-6 (C₂₀:4n6) indiquant donc que sa première double liaison carbone-carbone (C=C) se situe à la sixième liaison en comptant à partir du groupement méthyl terminal (CH₃). L'ARA sert de base moléculaire pour la production d'une grande famille d'hormones locales nommées eicosanoïdes. Ces eicosanoïdes sont des éléments régulateurs importants dans l'inflammation, la régulation cellulaire, l'angiogenèse et l'agrégation plaquettaire (Annexe A) (Frédéric Desmarais, Bergeron, Ntambi, Rassart, & Mounier, 2020). La capacité de l'ApoD à lier l'ARA la place donc au centre de plusieurs mécanismes présumés de contrôle de l'inflammation et de la régulation du cycle cellulaire. Deux éléments qui seront discutés plus en détail ultérieurement. Il est intéressant de remarquer que bien que l'ApoD ait une grande affinité pour l'ARA, elle ne démontre pas d'affinité pour les eicosanoïdes testés jusqu'à présent (Morais Cabral et al., 1995; Ruiz et al., 2013). En fait, les seuls composés chimiquement reliés à l'ARA pour laquelle l'ApoD a une certaine affinité seraient l'anandamide (K_a de $0.63 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$) et l'acide arachidique (K_a de $0.63 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$) (Jankovic-Karasoulos et al., 2020). Un point qui est particulièrement intéressant d'aborder ici est que l'ApoD semble perdre la majeure partie de son affinité pour l'ARA lorsqu'elle est produite chez la bactérie. L'étude de Vogt M *et al.*, 2001 a utilisée de l'ApoD humaine recombinante produite chez *Escherichia coli* pour effectuer leurs tests d'affinité. Ce faisant, ils ont uniquement obtenu une K_a de $0.31 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ (Sanchez et al., 2008), soit beaucoup plus faible que celle obtenue avec de l'ApoD humaine purifiée ($1.62 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$) (Morais Cabral et al., 1995). Il est possible qu'une modification post-traductionnelle absente chez les bactéries soit responsable de cette perte d'affinité. Puisque l'ApoD est hautement glycosylée, l'absence de N- et O-glycosylation chez la bactérie (N. Jenkins, Parekh, & James, 1996) pourrait être un

facteur important dans la capacité de l'ApoD à lier ces ligands. Ce type de phénomène existe d'ailleurs chez d'autres glycoprotéines et affecte entre autres la capacité de liaison du CD244 et de la basigine (Margraf-Schonfeld, Bohm, & Watzl, 2011; W. Tang, Chang, & Hemler, 2004). La différence du degré de glycosylation entre les divers tissus producteurs d'ApoD pourrait donc même jouer un rôle important dans l'affinité que chaque forme d'ApoD possède pour différents ligands.

1.1.3.2 Stéroïdes

Le second ligand avec la plus forte affinité pour l'ApoD est la progestérone (K_a de 10^6 M^{-1}) (Balbin, Freije, Fueyo, Sanchez, & Lopez-Otin, 1990; Lea, 1988; Morais Cabral et al., 1995; Pearlman, Guériguian, & Sawyer, 1973; Vogt & Skerra, 2001). Il a également été rapporté que l'ApoD lie également la prégénolone, un minéralocorticoïde (Tableau 1.1). L'ApoD aurait par contre, une très faible affinité pour le cortisol et la testostérone. Selon les auteurs, elle aurait également une très faible affinité de l'ApoD pour l'œstrogène (β -estradiol) (Dilley, Haagensen, Cox, & Wells, 1990; Ruiz et al., 2013). Il est intéressant d'observer que la production d'ApoD humaine recombinante chez *E. coli* ne semble pas ou peu affecter l'affinité de l'ApoD pour la progestérone (Dilley et al., 1990; Morais Cabral et al., 1995; Vogt & Skerra, 2001).

1.1.3.3 Cholestérol

L'affinité de l'ApoD pour le cholestérol est toujours sujet à débat. Dépendamment des études et des techniques utilisées, une affinité pour le cholestérol a été observée (Patel, Lange, McConathy, Patel, & Patel, 1997) ou non (Morais Cabral et al., 1995; Ruiz et

al., 2013). Il faut toutefois remarquer que le cholestérol est une molécule hautement hydrophobe principalement retrouvée dans les membranes cellulaires. Ainsi, la plupart des tests de liaison, effectués en milieu aqueux, ne reflètent pas l'environnement physiologique dans laquelle l'ApoD peut se trouver en contact avec le cholestérol. Une technique faisant appel à l'incorporation de cholestérol dans des liposomes avait donc été élaborée par l'équipe du Dr. Rassart afin de déterminer si le cholestérol est effectivement un ligand de l'ApoD. Cette étude a démontré que le cholestérol était un ligand de l'ApoD avec un ratio molaire de liaison ligand/protéine de 0.15 (Marcoux-Legault, 1997). Considérant la méthode plus adaptée de cette étude, on peut donc conclure que le cholestérol est en effet un ligand de l'ApoD (Tableau 1.1).

1.1.3.4 Autres ligands testés

Les ligands les plus évidents et pertinents pour le sujet de recherche de cette thèse ont été présentés plus haut. Toutefois, des études ont également testé de multiples autres molécules afin de déterminer s'ils pouvaient être des ligands de l'ApoD. Afin de ne pas allonger inutilement le texte, ces molécules ne seront pas discutées ici. Toutefois, les molécules ainsi que la K_a déterminée pour l'association avec l'ApoD dans chaque étude est exposée dans le tableau 1.1.

Tableau 1.1 : Molécules testées comme potentiels ligands d'ApoD et leur K_a

Molécule	$K_a \times 10^6 \text{ M}^{-1}$	pH	Protein	Référence
Acide Arachidonique*	162	7.0	hApoD	Morais Cabral JH <i>et al.</i> , 1995

	0.31†	6.0	hApoD	Vogt M et Skerra A, 2001
	7.04†	7.0	Lazarillo (<i>E. coli</i>)	Sanchez D <i>et al.</i> , 2008
Progestérone*	2.53	7.0	hApoD	Morais Cabral JH <i>et al.</i> , 1995
	1.00	5.3	hApoD	Dilley WG <i>et al.</i> , 1990
	1.67†	5.0	hApoD	Vogt M et Skerra A, 2001
	1.61†	6.0	hApoD	
	0.58†	7.0	hApoD	
	0.26†	8.0	hApoD	
Prégnénolone*	1.32	5.3	hApoD	Dilley WG <i>et al.</i> , 1990
	--- ^b †	7.5	hApoD	Vogt M et Skerra A, 2001
5β-pregnan-3-ol-one	0.91	5.3	hApoD	Dilley WG <i>et al.</i> , 1990
5α-pregnan-3,20-dione	0.83	5.3	hApoD	Dilley WG <i>et al.</i> , 1990
5β -pregnan-3,20-dione	0.80	5.3	hApoD	Dilley WG <i>et al.</i> , 1990
Promégestone	0.42	5.3	hApoD	Dilley WG <i>et al.</i> , 1990
Rétinol	5.00	7.0	hApoD	Ruiz M <i>et al.</i> , 2013
	1.11	7.0	NLaz	Ruiz M <i>et al.</i> , 2013

	0.47	7.0	Laz (S2)	Ruiz M <i>et al.</i> , 2013
Acides- <i>trans</i> -rétinoïques	0.25	7.0	hApoD	Ruiz M <i>et al.</i> , 2013
	0.71	7.0	NLaz	Ruiz M <i>et al.</i> , 2013
	0.33	7.0	Laz (S2)	Ruiz M <i>et al.</i> , 2013
	0.38†	7.0	Lazarillo (<i>E. coli</i>)	Ruiz M <i>et al.</i> , 2013
	0.19†	7.0	Lazarillo (<i>E. coli</i>)	Sanchez D <i>et al.</i> , 2008
Lysophosphatidylcholine	0.88	7.0	hApoD	Garcia-Mateo N <i>et al.</i> , 2014
Megestrol acétate	0.22	5.3	hApoD	Dilley WG <i>et al.</i> , 1990
Médroxyprogestérone acétate	0.22	5.3	hApoD	Dilley WG <i>et al.</i> , 1990
17 α -hydroxy-4- pregnene-3,20-dione	>0.20 ^a	5.3	hApoD	Dilley WG <i>et al.</i> , 1990
17 α -hydroxy-5- pregnene-3-one-20-ol	>0.20 ^a	5.3	hApoD	Dilley WG <i>et al.</i> , 1990
20 α -hydroxy-4- pregnene-3-one	>0.20 ^a	5.3	hApoD	Dilley WG <i>et al.</i> , 1990
Deoxycorticosterone	>0.20 ^a	5.3	hApoD	Dilley WG <i>et al.</i> , 1990
Estrone	>0.20 ^a	5.3	hApoD	Dilley WG <i>et al.</i> , 1990
17 β -Estradiol	>0.20 ^a	5.3	hApoD	Dilley WG <i>et al.</i> , 1990

	--- ^b	7.0	hApoD	Ruiz M <i>et al.</i> , 2013
Cortisol	>0.20 ^a	5.3	hApoD	Dilley WG <i>et al.</i> , 1990
Testostérone	>0.20 ^a	5.3	hApoD	Dilley WG <i>et al.</i> , 1990
	--- ^{b†}	7.5	hApoD	Vogt M et Skerra A, 2001
Cholestérol	--- ^b	7.0	hApoD	Morais Cabral JH <i>et al.</i> , 1995
	? ^c	?	hApoD	Patel RC <i>et al.</i> , 1997
	--- ^b	7.0	hApoD	Ruiz M <i>et al.</i> , 2013
	0.28	7.0	NLaz	Ruiz M <i>et al.</i> , 2013
	--- ^b	7.0	Laz (S2)	Ruiz M <i>et al.</i> , 2013
Ergostérol	--- ^b	7.0	hApoD	Ruiz M <i>et al.</i> , 2013
	0.37	7.0	NLaz	Ruiz M <i>et al.</i> , 2013
	0.50	7.0	Laz (S2)	Ruiz M <i>et al.</i> , 2013
4-androstene-3,17-dione	>0.20 ^a	5.3	hApoD	Dilley WG <i>et al.</i> , 1990
Bilirubine	--- ^{b†}	8.0	hApoD	Vogt M et Skerra A, 2001
<i>E</i> -3-methyl-2-hexenoic acid	--- ^{b†}	7.5	hApoD	Vogt M et Skerra A, 2001
Prostaglandine D ₂	--- ^b	7.0	hApoD	Morais Cabral JH <i>et al.</i> , 1995

Prostaglandine E ₁	--- ^b	7.0	hApoD	Morais Cabral JH <i>et al.</i> , 1995
Prostaglandine F _{2α}	--- ^b	7.0	hApoD	Morais Cabral JH <i>et al.</i> , 1995
5,15-diHETE	--- ^b	7.0	hApoD	Morais Cabral JH <i>et al.</i> , 1995
12-HETE	--- ^b	7.0	hApoD	Morais Cabral JH <i>et al.</i> , 1995
2-Arachidonylglycerol	--- ^b	7.0	hApoD	Ruiz M <i>et al.</i> , 2013
Anandamide	0.63	7.0	hApoD	Ruiz M <i>et al.</i> , 2013
Acide Arachidique	0.22	7.0	hApoD	Ruiz M <i>et al.</i> , 2013
EP092*	? ^c	7.0	hApoD	Morais Cabral JH <i>et al.</i> , 1995
Acide linoléique	--- ^b	7.0	hApoD	Morais Cabral JH <i>et al.</i> , 1995
	11.91 [†]	7.0	Lazarillo (<i>E. coli</i>)	Sanchez D <i>et al.</i> , 2008
Acide oléique	--- ^b	7.0	hApoD	Morais Cabral JH <i>et al.</i> , 1995
Acide palmitique	--- ^b	7.0	hApoD	Morais Cabral JH <i>et al.</i> , 1995
	0.30	7.0	hApoD	Ruiz M <i>et al.</i> , 2013
	0.21	7.0	NLaz	Ruiz M <i>et al.</i> , 2013

	11.68 [†]	7.0	Lazarillo (<i>E. coli</i>)	Sanchez D <i>et al.</i> , 2008
Palmitoyl sphingomyelin	0.76	7.0	hApoD	Ruiz M <i>et al.</i> , 2013
	0.21	7.0	Nlaz	Ruiz M <i>et al.</i> , 2013
	0.37	7.0	Laz (S2)	Ruiz M <i>et al.</i> , 2013
	--- ^{b†}	7.0	Lazarillo (<i>E. coli</i>)	Ruiz M <i>et al.</i> , 2013
1-Palmitoleoyl-2- linolenoyl- phosphoethanolamine	--- ^b	7.0	hApoD	Ruiz M <i>et al.</i> , 2013
	--- ^b	7.0	Nlaz	Ruiz M <i>et al.</i> , 2013
	--- ^{b†}	7.0	Laz (S2)	Ruiz M <i>et al.</i> , 2013
7(z)-Tricosene	0.22	7.0	NLaz	Ruiz M <i>et al.</i> , 2013
7(z),(11)- Heptacosadiene	--- ^b	7.0	NLaz	Ruiz M <i>et al.</i> , 2013
11- <i>cis</i> -vaccenil-acetate	--- ^b	7.0	NLaz	Ruiz M <i>et al.</i> , 2013
20-Hydroxyecdysone	--- ^b	7.0	NLaz	Ruiz M <i>et al.</i> , 2013

^a Jugée comme n'étant pas un ligand d'ApoD par l'auteur de l'étude.

^b Non détectable.

^c Affinité détectée, mais où la K_a n'est pas fournie

* Ligand reconnu d'ApoD

[†] Étude effectuée avec de l'ApoD recombinante produite dans *E. Coli*.

hApoD, *ApoD humaine*; Laz, *Lazarillo*; NLaz, *Lazarillo Neurale* provenant de *Drosophila melanogaster*, Laz (S2), *Lazarillo* provenant de *Schistocerca americana* et produite dans les cellules S2

1.1.4 L'expression de l'ApoD

1.1.4.1 Expression tissulaire

La conservation de l'ApoD à travers l'évolution souligne son importance dans le règne animal. Chez les mammifères, l'ApoD est exprimée à divers niveaux dans de multiples organes. Le patron d'expression de l'ApoD peut toutefois être fort différent selon l'espèce (Figure 1.2). Un dominateur commun est toutefois la forte expression en ARNm de l'ApoD dans le cerveau et une absence ou quasi-absence d'expression en ARNm dans le foie (Rassart et al., 2020). C'est chez l'humain que l'on retrouve le patron d'expression (ARNm) le plus diversifié. En plus du cerveau, les glandes mammaires, le tissu adipeux et la moelle épinière expriment fortement l'ApoD (Figure 1.2). En contraste avec l'humain, chez la souris, l'ApoD n'est exprimée fortement que dans le cerveau et la moelle épinière (Rassart et al., 2020).

De manière intéressante, la biodistribution de la protéine est généralement plus harmonisée. Des organes dépourvus ou ayant une faible expression en ARNm ont pourtant de robustes niveaux d'expression protéique (Rassart et al., 2020). Ce phénomène est majoritairement explicable par la nature de l'ApoD en tant que protéine circulante. La présence d'ApoD à la surface des HDL (Perdomo et al., 2010) peut certainement aider à expliquer la forte présence d'ApoD dans le foie. La raison et les mécanismes entourant l'accumulation d'ApoD dans d'autres organes restent toutefois nébuleux.

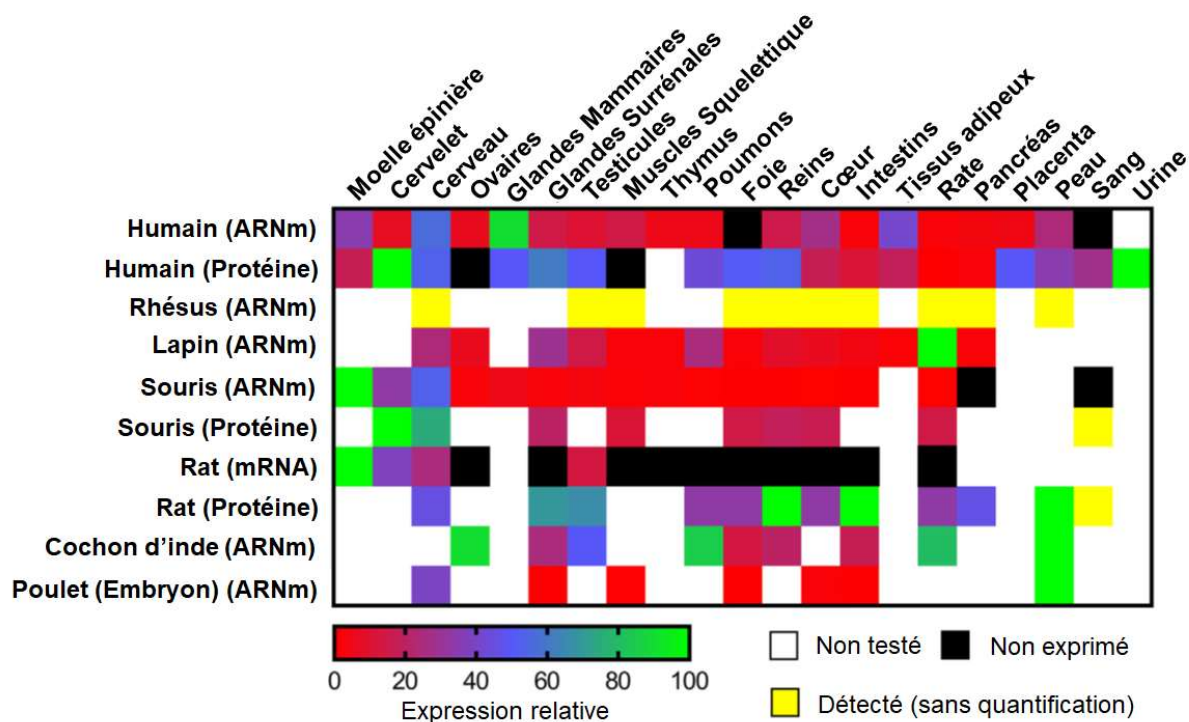


Figure 1.2 : Expression relative de l'ApoD en ARNm et en protéine dans les tissus chez plusieurs espèces (Modifiée de Rassart E *et al.* 2020). La valeur de l'expression de l'ApoD dans cette figure est une moyenne des valeurs retrouvées dans la littérature. L'expression de l'ApoD est exprimée en tant que pourcentage relatif au tissu dans lequel l'ApoD est la plus fortement exprimée pour cette espèce. L'expression tissulaire ne devrait pas être directement comparée entre espèces puisque ces expressions sont uniquement relatives au sein de la même espèce. Les tissus pour lesquels l'ApoD a été détectée, mais n'a pas été quantifiée sont notés en jaune.

1.1.4.2 Expression cellulaire

L'expression en ARNm d'ApoD se produit majoritairement dans les fibroblastes et en particulier dans les fibroblastes localisés en périphérie des vaisseaux sanguins (P. R. Provost et al., 1991; K. M. Smith et al., 1990). Dans le SNC, l'expression de l'ApoD est particulièrement forte dans les cellules gliales de la matière blanche, soit les astrocytes et les oligodendrocytes. Toutefois, l'ApoD est surtout exprimée par les fibroblastes endoneuriaux dans le système nerveux périphérique (Boyles, Notterpek, Wardell, & Rall, 1990; P. R. Provost et al., 1991).

1.1.4.3 Modulation de l'ApoD dans les maladies neurodégénératives et autres troubles neurologiques

Le niveau d'expression de l'ApoD est grandement augmenté en réponse à des lésions ou dommages neurologiques. En outre, cette augmentation en expression est particulièrement évidente dans le liquide cébrospinal, l'hippocampe et le cortex cérébral des patients souffrant d'Alzheimer (Desai et al., 2005; Kalman, McConathy, Araoz, Kasa, & Lacko, 2000; Terrisse et al., 1998). Aussi, la concentration d'ApoD dans l'hippocampe et dans le liquide cébrospinal corrèle avec le degré de dégénération (« *Braak degeneration stage* ») (Glöckner & Ohm, 2003) et varie en fonction du génotype en ApoE (Glöckner & Ohm, 2003). La schizophrénie est une autre maladie dans laquelle les niveaux d'expression d'ApoD sont augmentés. On retrouve notamment une élévation de son expression dans le plasma et dans le cerveau (post-mortem) des patients souffrant de la maladie (Mahadik, 2002; E. A. Thomas, Copolov, & Sutcliffe, 2003; E. A. Thomas, Dean, Pavey, & Sutcliffe, 2001). La schizophrénie est caractérisée par le mauvais fonctionnement de l'activité des neurotransmetteurs, affectant ainsi les systèmes sérotoninergiques, glutamatergiques et dopaminergiques (Rassart et al., 2020). Une altération du métabolisme des

phospholipides ainsi qu'une déficience dans l'incorporation d'ARA dans les érythrocytes, ainsi qu'une déficience centrale en ARA contribueraient à la progression de la maladie (Rassart et al., 2020). Or, une augmentation de l'expression en ApoD est liée à l'amointrissement de ces déficiences en ARA chez l'humain et les rongeurs (Ciapparelli et al., 2003; Mahadik, 2002; E. A. Thomas et al., 2001; E. A. Thomas & Yao, 2007). Un autre exemple de troubles neurologiques où l'expression en ApoD est augmentée inclut également la maladie de Niemann-Pick de type C, une maladie neurodégénérative causée par une déstabilisation du transport de cholestérol (Rassart et al., 2020).

De manière générale, l'ApoD est surexprimée lors du processus de réparation tissulaire dans le cerveau (Rassart et al., 2020). Cela a par exemple été démontré chez les rongeurs ayant subi une lésion du cortex cérébral (Terrisse et al., 1999), une injection d'acide kaïnique, une molécule excitotoxique, (Montpied, de Bock, Lerner-Natoli, Bockaert, & Rondouin, 1999; Ong, He, Suresh, & Patel, 1997) et à la suite d'accidents vasculaires cérébraux provoqués (Rickhag, Deierborg, Patel, Ruscher, & Wieloch, 2008; Rickhag et al., 2006) (Voir l'annexe B pour plus d'information).

1.1.4.4 Modulation de l'ApoD en conditions physiologiques

Chez les individus normaux, la concentration d'ApoD dans le sérum varie de 5 à 23 mg/100 ml (Camato et al., 1989), mais elle peut varier considérablement dans le cas de certaines pathologies et en réponse à plusieurs stimuli (Rassart et al., 2020).

Les maladies métaboliques tel que la maladie de Tangier aussi appelée la déficience familiale en HDL (Alaupovic et al., 1981), la déficience familiale en Lecithin-Cholesterol Acyltransférase (LCAT) (Albers et al., 1985) et le diabète de type II (*type*

2 *diabetes*, T2D) (Baker et al., 1994; Hansen et al., 2004) sont des exemples de pathologies où l'expression de l'ApoD est augmentée. Toutes ces maladies, incluant les maladies neurodégénératives mentionnées plus haut, ont un point commun, soit l'activation de processus pro-inflammatoires ou pro-angiogéniques. De manière intéressante, la transformation d'ARA en divers eicosanoïdes est nécessaire afin de provoquer les divers effets biologiques caractérisant ces processus. Dans ces circonstances, l'ApoD jouerait un rôle inhibiteur sur ces processus puisqu'elle capte l'ARA avec une forte efficacité (Hummasti et al., 2004; Labrie et al., 2015). L'ApoD a la capacité de stabiliser et séquestrer l'ARA dans les membranes cellulaires et donc de limiter sa libération et son utilisation dans la création d'eicosanoïdes souvent pro-inflammatoires. Ce mécanisme est jugé particulièrement important dans la défense du cerveau contre les stress pro-inflammatoires (E. A. Thomas et al., 2003; E. A. Thomas, George, & Sutcliffe, 2003).

1.1.4.5 Croissance, différenciation et stress

Un élément intéressant de l'expression de l'ApoD est son induction lors de la sénescence cellulaire. L'expression en ApoD est augmentée dans les fibroblastes humains en réponse à un arrêt de croissance (Pierre R. Provost, Marcel, Milne, Weech, & Rassart, 1991). Une haute expression d'ApoD dans les cellules quiescentes a également été observée dans les fibroblastes de souris (Do Carmo et al., 2002).

Une augmentation de l'expression d'ApoD est également observée en réponse à plusieurs stress tels que le stress oxydatif, l'inflammation et le traitement aux UV (Do Carmo et al., 2007). Il est à noter que cet effet d'induction de l'expression d'ApoD survient spécifiquement à des niveaux de stress suffisant à provoquer un arrêt de croissance, mais pas à des niveaux menant à l'apoptose. Cette induction d'expression

survient au moins en partie par l'intermédiaire de l'action des facteurs de transcription *poly ADP-ribose polymerase-1* (PARP-1) et *apurinic/aprimidinic endonuclease-I* (APEX). PARP-1 et APEX sont tous deux des facteurs de transcription qui sont activés lors de l'arrêt de croissance (Duan, Gross, & Sheu, 2007; Fritz, Grösch, Tomicic, & Kaina, 2003). Lors d'épisodes de stress comme ceux engendrés par l'inflammation et le stress oxydatif dans les maladies neurodégénératives, ces facteurs de transcription se lient au promoteur du gène *APOD* et induisent son expression (Levros et al., 2010). De manière intéressante, de l'ApoD est détectable (protéine) dans l'espace périnucléaire suite à l'induction de nombreux stress (Do Carmo et al., 2007).

Il existe d'ailleurs des corrélations montrant que l'expression d'ApoD est inversement proportionnelle à la croissance cellulaire. L'expression de l'ApoD est réduite dans des cellules de lignée ZR-75-1 de cancer du sein après leur traitement avec de l'œstrogène, une hormone qui stimule la croissance cellulaire chez ces cellules (Simard et al., 1990). En contrepartie, l'expression de l'ApoD est augmentée par les traitements avec des androgènes, des hormones qui inhibent la croissance cellulaire de ces mêmes cellules et sur des cellules LNCaP issues du cancer de la prostate (Simard et al., 1990; Simard, Veilleux, de Launoit, Haagensen, & Labrie, 1991). La stimulation de l'expression de l'ApoD a aussi été observée en réponse à l'arrêt de croissance de cellules du cancer du sein ZR-75-1 en réponse à des traitements à l'interleukine-1 α et à l'acide rétinoïque (Blais et al., 1994; Simard et al., 1991). De manière générale, l'expression de l'ApoD est stimulée par l'induction d'un arrêt de croissance des cellules. La seule exception connue à cette règle est liée à l'action de l'*interleukine-6* (IL-6). L'IL-6 inhibe à la fois la croissance cellulaire dans plusieurs types cellulaires (Moran, Mattocks, Cahill, Koniaris, & McKillop, 2008; Morse, Chen, Franklin, Xiong, & Chen-Kiang, 1997) et l'expression de l'ApoD (Blais et al., 1995). Il est toutefois intéressant de mentionner que l'IL-6 est une cytokine pléiotrope qui possède également des fonctions physiologiques indépendantes de l'induction de l'inflammation, tel que la stimulation

de la sécrétion du *receptor activator of nuclear factor- κ B ligand* (RANKL) et donc de la maturation des ostéoclastes (Tanaka, Narazaki, & Kishimoto, 2014).

En plus de l'arrêt de croissance, la différenciation cellulaire affecte également l'expression de l'ApoD. L'acide rétinoïque et la *1,25-dihydroxyvitamin D3* sont tous deux des médiateurs de la différenciation cellulaire. Or, ces deux molécules induisent toutes deux l'expression de l'ApoD dans les cellules du cancer du sein exprimant le récepteur à l'estrogène (T-47D et ZR-75-1), mais pas dans les cellules n'exprimant pas ce récepteur (MDA-MB-231 et MDA-MB-435) (Y. S. López-Boado et al., 1997; Y. S. López-Boado, Tolivia, & López-Otín, 1994). Cet effet serait médié par l'activation des *retinoic acid nuclear receptors* (RAR) qui sont connus pour réduire la croissance cellulaire. L'ApoD pourrait donc être un marqueur de la différenciation cellulaire et de l'arrêt de croissance RAR-dépendante dans les cellules de cancer du sein exprimant le récepteur de l'estrogène (Lopez-Boado, Klaus, Dawson, & Lopez-Otin, 1996). Similairement, l'expression de l'ApoD est positivement corrélée à l'état non prolifératif et de la différenciation cellulaire dans le cancer de la prostate (Aspinall et al., 1995).

1.1.5 Influence des voies métaboliques

Il existe aussi une corrélation positive entre la masse adipeuse, les niveaux circulants de leptine et l'expression hypothalamique d'ApoD (Liu, Chang, & Leibowitz, 2001). Toutefois, cette corrélation disparaît chez les souris déficientes en leptine (*ob/ob*) et chez les souris ayant une mutation inactivant le récepteur à la leptine (*db/db*). Ces souris transgéniques sont caractérisées par un appauvrissement hypothalamique d'ApoD comparativement à leurs congénères de type sauvage (*wild type*, WT). L'étude de Liu *et al.*, 2001 démontre que l'ApoD peut directement interagir avec la portion cytoplasmique de la forme longue du récepteur à la leptine (Liu et al., 2001). Cette

interaction suggère que l'ApoD pourrait jouer un rôle dans la signalisation de la leptine et donc en outre dans le contrôle de l'appétit. Par conséquent, l'ApoD a donc également le potentiel d'influencer indirectement la prise de poids via cette interaction. On pourrait donc penser que l'absence d'ApoD pourrait participer à la prise de poids des animaux, en particulier sous une diète riche en gras (Liu et al., 2001).

Les niveaux plasmatiques d'ApoD diminuent significativement au cours des grossesses sans complication. De manière intéressante, cette diminution est encore plus marquée chez les femmes ayant un gain de poids gestationnel important (>18 kg). Cet appauvrissement est également plus marqué chez les nouveaux nés issus des grossesses où la mère a eu un gain de poids gestationnel important (Do Carmo, Forest, et al., 2009). De manière intéressante, chez ces femmes, les niveaux circulants d'ApoD sont inversement corrélés à de multiples paramètres lipidiques. Ces paramètres incluent les taux circulants de cholestérol (HDL et LDL), d'acides gras libres, d'ApoA-I et d'ApoB-100. Seuls les taux circulants de triglycérides sont positivement corrélés à ceux d'ApoD chez ces femmes (Do Carmo, Forest, et al., 2009). Ces résultats sont intéressants dans le contexte des observations de Liu *et al.* 2001 qui relevaient le fait que l'expression en ApoD, du moins dans l'hypothalamus, augmente en réponse à la prise de poids et à la consommation d'une diète obésogène. Il semble donc y avoir deux pressions physiologiques s'affrontant. Soit entre la présence de gras sous formes de triglycérides, liés à une augmentation de l'expression en ApoD, et d'autres composantes physiologiques menant à une réduction de l'expression de l'ApoD chez les femmes avec une forte prise de poids gestationnel. Les mécanismes exacts responsables de ces phénomènes sont toutefois encore inconnus.

Un élément intéressant de la régulation d'ApoD est que le gène *APOD* est régulé par le facteur de transcription LXR et dont l'expression est augmentée lors de la différenciation des préadipocytes en adipocytes. Les auteurs ont émis l'hypothèse que

l'ApoD pourrait transporter les ligands permettant d'activer LXR et les facteurs de transcription PPAR (*peroxisome proliferator-activated receptor*) dans les adipocytes différenciés (Hummasti et al., 2004). Le traitement d'adipocytes 3T3-L1 avec de l'ARA augmente l'expression et l'incorporation des transporteurs de glucose GLUT1 et GLUT4 dans les membranes de ces cellules. Par conséquent, l'addition d'ARA aux adipocytes augmente indirectement leur capacité à capter le glucose. De manière intéressante, l'inhibition de PPAR γ , de l'activité des lipoxygénases, mais pas des cyclooxygénases, abolit cet effet (Nugent et al., 2001). Il est donc probable qu'une partie de l'effet de l'ApoD sur l'homéostasie du glucose dans les adipocytes soit imputable à la modulation de la production d'eicosanoïdes et à la présentation de ligands à PPAR γ .

Une fonction supplémentaire de l'ApoD dans le tissu adipeux et dans le contrôle de l'inflammation pourrait aussi être due à sa capacité à lier l'ostéopontine (OPN) (Jin, El-Tanani, & Campbell, 2006). L'OPN est une protéine extracellulaire produite par de nombreux types cellulaires et retrouvée dans de nombreux tissus incluant les os, les reins, le placenta et les muscles lisses artériels. L'OPN induit la migration, l'adhésion et l'activation des lymphocytes T et des macrophages (Gravallese, 2003; Jurets et al., 2016). L'OPN est surexprimée dans l'athérosclérose et dans les tissus adipeux lors de l'inflammation métabolique liée à l'obésité. Dans ces circonstances, l'OPN permet le recrutement de macrophages à partir de la circulation sanguine (Giachelli, Liaw, Murry, Schwartz, & Almeida, 1995; Nomiya et al., 2007). Or, de par sa capacité à lier l'OPN, l'ApoD pourrait réduire l'invasion des tissus par les macrophages en bloquant la signalisation l'OPN (Jin et al., 2006). La déficience en OPN chez les souris obèses est liée à une réduction de la résistance à l'insuline et du recrutement de macrophages dans les tissus adipeux ainsi qu'une réduction de l'inflammation métabolique (Nomiya et al., 2007). L'OPN jouerait également des fonctions pro-inflammatoires et profibrotiques dans le foie (Bruha, Vitek, & Smid, 2020). Par conséquent, l'ApoD

pourrait jouer un rôle anti-inflammatoire important dans les tissus métaboliques en bloquant les fonctions pro-inflammatoires de l'OPN.

L'ApoD semble également jouer un rôle dans le métabolisme des triglycérides. Les souris déficientes en ApoD souffrent d'hypertriglycéridémie et sont hyperphagiques (augmentation de 30-50% de la prise alimentaire). Ces souris ne sont toutefois pas caractérisées par une masse corporelle plus élevée que celles des souris WT. D'autant plus étrange, ces souris ont une tolérance au glucose normale et la morphologie de leurs îlots pancréatiques est également normale. Enfin, l'activité de la *lipoprotéine lipase* (LPL) dans le tissu adipeux est réduite et le contenu hépatique en triglycéride est bas (Jimenez-Palomares, Cozar-Castellano, Ganfornina, Sanchez, & Perdomo, 2011). Inversement, l'expression hépatique transitoire de l'ApoD dans des souris augmente l'activité plasmatique de la LPL et accélère la « *clearance* » des triglycérides. L'ApoD augmente également et de manière dose dépendante le relargage des triglycérides dans les essais *in vitro* avec des VLDL co-incubés avec de la LPL purifiée (Perdomo et al., 2010).

Les souris femelles déficientes en ApoD présentent aussi une accélération de perte de la masse osseuse lors du vieillissement. Cette perte de masse atteint même une réduction de 50% du volume osseux trabéculaire. Le volume osseux cortical est également réduit de 24% chez les femelles et les mâles (Martineau, Najyb, Signor, Rassart, & Moreau, 2016). Cette perte de masse est caractérisée par une augmentation du nombre d'ostéoclastes, les cellules responsables de la résorption osseuse, dans les os (fémur) des animaux (Martineau et al., 2016). Le RANKL, l'effecteur final du processus de l'ostéoclastogenèse, le processus de différenciation des ostéoclastes, et de la résorption osseuse, est surexprimé par les cellules mésenchymateuses issues de la moelle osseuse des souris déficientes en ApoD. Cette surexpression est toutefois renversée dans les de cellules mésenchymateuses primaires par l'addition d'ApoD au

milieu de culture (Martineau et al., 2016). L'expression et la sécrétion successive de RANKL par les ostéoblastes est stimulée par certaines cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1, le TNF- α et le *macrophage colony stimulating factor* (M-CSF) (Weitzmann, 2013). Dans l'étude de Martineau *et al.*, 2016, les auteurs ont émis l'hypothèse que les effets de l'ApoD sur la densité osseuse et la production de RANKL seraient probablement médiés via les fonctions anti-inflammatoires et antioxydantes de l'ApoD.

1.1.6 Souris Tg(THY1-APOD1)1Era (ou hApoD)

Les souris ici appelées hApoD (lignée Tg(THY1-APOD1)1Era) à des fins de simplicité, sont des souris transgéniques surexprimant le gène de l'ApoD humaine sous le contrôle du promoteur du gène *Thy1* (*Cd90*). La protéine Thy1 est abondamment exprimé dans les neurones chez la souris. L'expression de protéines fluorescentes sous l'influence du promoteur de ce gène est d'ailleurs une approche régulièrement utilisée en imagerie cellulaire afin d'identifier les neurones (G. Feng et al., 2000). L'utilisation de ce promoteur permet donc d'exprimer l'ApoD humaine principalement dans les neurones des souris. Il est cependant important de souligner que le gène *Thy1* est également exprimé dans le thymus, d'où le « Thy » de Thy1 (*Thymocyte differentiation antigen 1*). La protéine Thy1 est d'ailleurs présente à la surface des lymphocytes T et a été décrite comme un « *pan T-cell marker* » (Haeryfar & Hoskin, 2004) où elle est présente au sein des radeaux lipidiques (de Mello Coelho et al., 2004). Chez les souris hApoD, le patron d'expression du transgène en ARNm est donc le suivant : une forte expression au niveau du SNC (hypocampus, cérébelum, cortex, médulla et bulbe olfactif), accompagnée d'une expression modérée au niveau du cœur et du thymus suivit d'une

faible expression dans les yeux, et les testicules. Une faible expression avait également été détectée dans le foie, mais ce, uniquement par RT-PCR semi-quantitative et non par buvardage de type Northern (*Northern blot*) (Do Carmo, Fournier, et al., 2009). Il existe donc un doute quant à la présence d'ARNm de l'ApoD dans cet organe. Cependant, la protéine Thy-1 semble être exprimée dans les fibroblastes périportaux du foie (Katsumata, Miyajima, & Itoh, 2017). Dans le foie, les hépatocytes représentent 90% du poids de l'organe. Le reste (cellules endothéliales, cellules dendritiques, cellules de Kupffer, les fibroblastes, etc.) ne représente que le 10% restant (Alpini, Phillips, Vroman, & LaRusso, 1994). La faible proportion de cellules que représentent les fibroblastes périportaux pourrait donc expliquer cette faible expression d'ApoD dans le foie des souris transgéniques hApoD. La protéine est également détectable dans le plasma à une concentration de 5.35 µg/ml (Do Carmo, Fournier, et al., 2009). Les souris hApoD développent une stéatose hépatique, soit une accumulation anormale de gras dans le foie, douze mois après la naissance. Les souris hApoD présentent également une légère stéatose musculaire, ainsi qu'une résistance à l'insuline et une hyperinsulinémie à jeun (Do Carmo, Fournier, et al., 2009). De manière plus précise, une suractivation du facteur de transcription prolipogénique PPAR γ due à une accumulation d'ARA semble être responsable de la pathologie observée (Labrie et al., 2015). Il faut rappeler que l'ARA est le ligand préférentiel de l'ApoD. Dans ce cas, la stéatose hépatique pourrait donc indirectement être causée par une augmentation du transport d'ARA par l'ApoD, résultant en une suractivation de PPAR γ par l'ARA ou l'un de ses métabolites. Étonnamment, les souris hApoD ne semblent pas présenter d'inflammation chronique normalement associée aux stéatoses hépatiques de cette sévérité. Du moins, les niveaux de cytokines circulantes (réduction en IL-1 α , IL-10 et TNF- α et augmentation en IFN γ) ne correspondent pas à ce que l'on attendrait d'une inflammation hépatique (Do Carmo, Fournier, et al., 2009). Cela est doublement surprenant considérant que l'ARA est le précurseur de nombreux médiateurs lipidiques pro-inflammatoires (Annexe 1)(Frédéric Desmarais et al., 2020). Il faut toutefois

remarquer, ici, que ces observations n'ont pas été menées directement sur le foie et qu'une étude plus exhaustive devrait être menée afin de réellement évaluer le statut inflammatoire de l'organe.

1.1.7 Métabolisme de l'acide arachidonique

Le métabolisme de l'ARA, si on inclut les eicosanoïdes qui en découlent, est particulièrement complexe. Il est d'abord synthétisé à partir de l'acide linoléique, suite à deux désaturations et une élongation (Figure 1.3). Par la suite, l'ARA libre peut être transformé en prostanoïdes, après transformation par les cycloxygénases, en leucotriènes, après transformation par la 5-lipoxygénase, ou en isoprostanes suite à une peroxydation non enzymatique (Figure 1.3).

L'ARA libre est cytotoxique, même à de faibles concentrations. L'utilisation d'ARA sur les cellules induit la fuite du cytochrome c des mitochondries, la dépolarisation mitochondriale, l'activation des caspases, le clivage de la polymérase poly(ADP)-ribose, la fragmentation de l'ADN internucléosomal, la condensation de la chromatine, la rupture nucléaire et finalement la perte d'intégrité de la membrane plasmique (Pompeia, Lima, & Curi, 2003). Chacun de ces phénomènes est impliqué dans l'apoptose cellulaire. Un relâchement d'ARA dans le cytoplasme est d'ailleurs également une caractéristique du processus d'apoptose induit par le TNF- α (Hollenbach, Zilli, & Laster, 1992; Mutch, Powell, Kao, & Collins, 1992; Wolf & Laster, 1999; Yagisawa & Osawa, 1982). C'est pour cela que la concentration cytoplasmique d'ARA est étroitement régulée. Une fois produit à partir de ses précurseurs ou après son internalisation par la cellule, l'ARA est rapidement emmagasiné dans les phospholipides. On retrouve donc particulièrement l'ARA dans les phosphatidylcholines (PC) et moindrement dans les phosphatidylinositols (PI) et les

phosphatidyléthanolamine (PE) (Tomita-Yamaguchi, Babich, Baker, & Santoro, 1990). L'incorporation d'ARA libre dans les phospholipides est tout d'abord catalysé par l'acyl coenzyme A synthétase pour obtenir l'arachidonate-CoA (ARA-CoA). Ensuite, l'ARA est transférée de l'ARA-CoA au PC par la phosphatidylcholine/CoA arachidonatetransacylase (Brash, 2001). L'ARA peut ensuite être transférée un fois de plus au PE par la transacylase CoA-indépendante. Enfin, la phospholipase A₂ (PLA₂) clive la PE pour libérer l'ARA. Ce mécanisme d'entreposage de l'ARA dans les phospholipides (PC et PE) permet donc de réguler la quantité d'ARA libre selon les besoins de la cellule. L'arrêt de ce processus par une inhibition de la formation de PE à partir de PC entraîne l'arrêt de la prolifération et l'apoptose des cellules (Brash, 2001; Surette, Winkler, Fonteh, & Chilton, 1996), un signe que l'ARA est un métabolite important dans la régulation du cycle cellulaire.

Il est généralement considéré que le réservoir principal de l'ARA dans les cellules est les phospholipides. Cependant, une quantité importante d'ARA peut également être emmagasinée dans les triglycérides. Cela est particulièrement évident dans des conditions où une large quantité d'ARA est présente dans l'environnement extracellulaire. Denning GM *et al.* 1983 ont d'ailleurs démontré que l'addition de 75 à 150 μM d'ARA au milieu de culture de cellules endothéliales bovines primaires résulte en une incorporation massive d'ARA dans les triglycérides. Dans ces conditions, le contenu en triglycéride des cellules augmentait de 5.5 fois par rapport au niveau basal. L'ARA représentait alors 22% du contenu lipidique des triglycérides (Denning, Figard, Kaduce, & Spector, 1983). Cela représente toutefois une énorme quantité d'ARA. Une étude plus récente a également reproduit ces résultats avec des quantités plus raisonnables. À une concentration de 20 μM ou plus, l'ARA, en plus de s'accumuler dans les phospholipides se retrouve également dans les triglycérides dans les cellules MCF-7, HepG2, THP-1 et Jurkat (Mbarik, Biam, Robichaud, & Surette, 2020).

Plusieurs fonctions biologiques sont associées à l'ARA, dont une part importante a trait à la modulation de la réaction inflammatoire. Historiquement, une méthode pour tester l'efficacité de molécules anti-inflammatoires était de les injecter conjointement avec des esters de phorbol, un composé réputé pour activer la PLA₂ et libérer l'ARA membranaire. La taille de l'œdème généré servait donc d'indicateur de l'efficacité du composé ainsi testé (Kuehl & Egan, 1980). Aujourd'hui, notre compréhension des mécanismes inflammatoires liés à l'ARA est plus complète et nuancée puisque l'on reconnaît que l'ARA peut également exercer des fonctions anti-inflammatoires à travers ses métabolites (Rajakariar et al., 2007). Ainsi, on comprend maintenant que ce composé est un modulateur (sans nécessairement être un instigateur) de l'inflammation et que son effet dépend également du climat inflammatoire présent. Toutefois, ces observations sont souvent dues aux effets des métabolites de l'ARA et non à l'ARA lui-même (Brash, 2001).

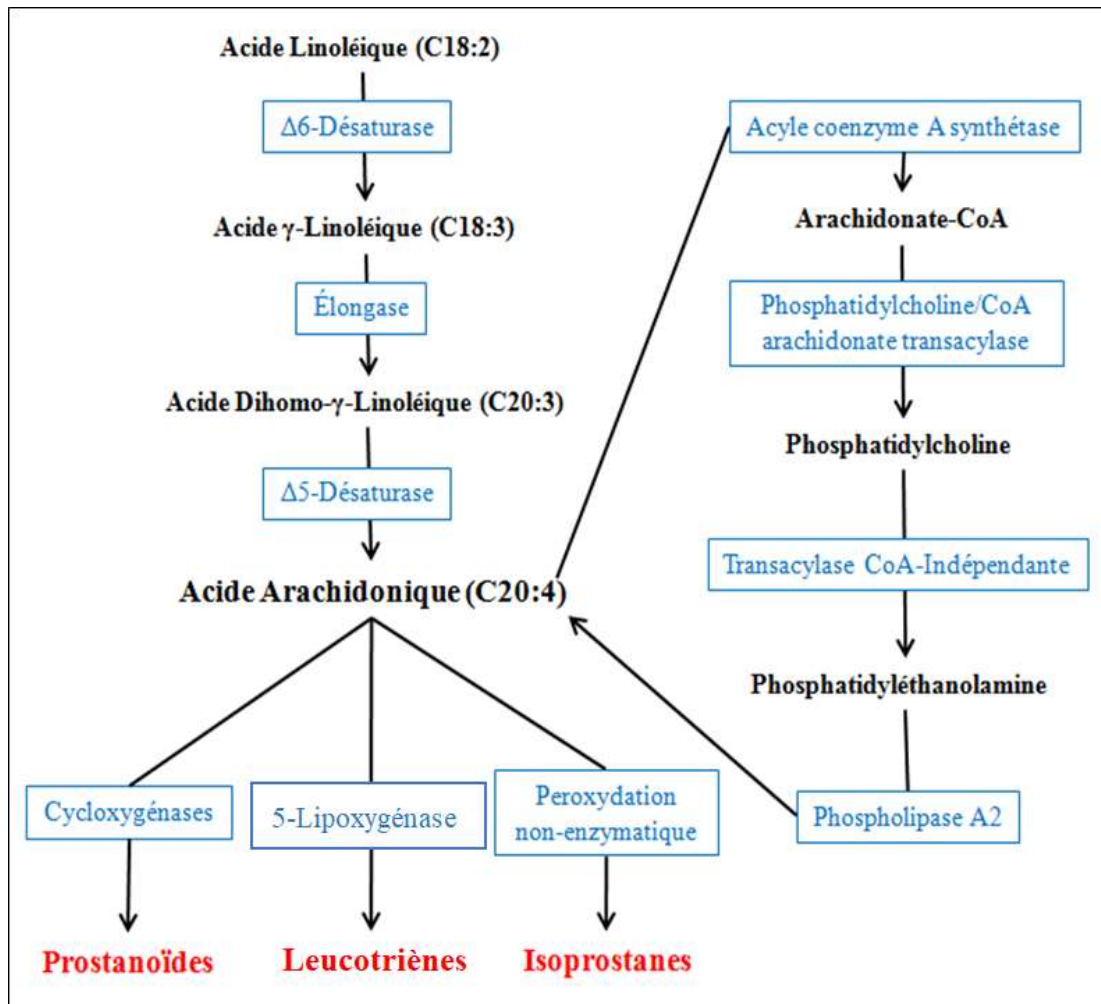


Figure 1.3: Métabolisme de l'acide arachidonique : de l'acide linoléique aux eicosanoïdes.

1.1.7.1 Prostanoïdes

Les prostanoïdes sont synthétisées dans la majorité des cellules. Celles-ci produisent généralement une ou deux prostanoïdes de manière dominante selon le type cellulaire. Cette production presque ubiquitaire s'explique par le fait que les prostanoïdes constituent un moyen de signalisation autocrine et paracrine majeur (Funk, 2001). Les prostanoïdes sont autant impliquées dans l'homéostasie que dans la gestion de la réaction inflammatoire. Toutes les prostanoïdes proviennent de la transformation de la prostaglandine H₂ (PGH₂), elle-même obtenue à partir de la transformation de l'acide arachidonique par une cyclo-oxygénase (COX) (Figure 1.4)(Ricciotti & FitzGerald, 2011).

Il existe deux isoformes de la COX. La COX-1 est constitutivement exprimée et participe essentiellement au maintien de l'homéostasie alors que la COX-2 est une forme hautement inductible qui est induite lors d'une réaction inflammatoire. Ces deux protéines sont encodées par les gènes *PTGS1* et *PTGS2* respectivement. Le caractère inductible de COX-2 provient de la modulation de l'expression de son gène *PTGS2* par des voies signalétiques comme celle de NF-κB. Le promoteur du gène *PTGS2* contient en effet plusieurs sites de liaison pour ces facteurs de transcription. Il contient notamment deux motifs NF-κB, deux sites AP-1 et deux éléments de réponse à l'AMPc (CREs) (Harper & Tyson-Capper, 2008). COX-2 peut donc être surexprimée en réponse à de nombreux stimuli comme la présence de pathogènes, de cytokines, d'oxyde nitrique, lors d'irradiations et en présence de facteurs de croissance (Harper & Tyson-Capper, 2008). Une particularité intéressante du foie des animaux adultes est que les hépatocytes sont majoritairement incapables d'exprimer la COX-2 (Martin-Sanz, Mayoral, Casado, & Bosca, 2010). Cela veut donc dire qu'une majorité des cellules hépatiques sont incapables d'élever substantiellement leur niveau de conversion de l'ARA en prostanoïdes. Leur production lors d'événements

inflammatoires est donc largement déléguée aux cellules de Kupffer et aux macrophages activés envahissant le tissu hépatique (Martin-Sanz et al., 2010).

Suite à la conversion de l'ARA en PGH_2 (Figure 1.4), cette dernière peut ensuite être retransformée par divers enzymes pour produire des prostaglandines ou des thromboxanes. Par exemple, la prostaglandine synthase produit la PGE_2 , alors que la thromboxane synthase produit la TXA_2 (Ricciotti & FitzGerald, 2011). On retrouve plusieurs fonctions antagonistes parmi les prostanoïdes. Alors que la PGI_2 (prostaglandine I_2 ou prostacycline) agit comme vasodilatateur et anticoagulant, la TXA_2 agit comme vasoconstricteur et incite l'agrégation plaquettaire. Il est à noter que la TXA_2 a une très courte demi-vie et se dégrade rapidement vers la forme inactive TXB_2 (Ricciotti & FitzGerald, 2011). Deux autres prostanoïdes ayant des fonctions opposées sont la PGE_2 et la série J des prostaglandines qui comprend plusieurs molécules provenant de la modification de la PGD_2 . La plus connue de cette série, la 15Δ -prostaglandine J_2 (15d-PGJ_2), est un anti-inflammatoire puissant (D. S. Straus et al., 2000), alors que la PGE_2 est essentiellement pro-inflammatoire (Nakanishi & Rosenberg, 2013). Cependant, la notion que la PGE_2 soit une prostaglandine strictement pro-inflammatoire est controversée. Une étude importante indique même que le niveau d'expression, faible ou élevé de la PGE_2 module l'effet qui sera ultimement obtenu. Alors qu'une concentration faible à modérée est pro-inflammatoire, une concentration élevée en PGE_2 semble au contraire anti-inflammatoire. Cette observation provient de l'étude des exsudats lors de réaction inflammatoire contrôlée (Levy, Clish, Schmidt, Gronert, & Serhan, 2001). Lors d'une réaction inflammatoire normale autolimitée, la concentration en PGE_2 augmente graduellement lors de la phase d'initiation inflammatoire, mais l'atteinte d'un pique de concentration est rapidement suivie par l'initiation du processus de résolution inflammatoire. Ce phénomène est expliqué par le fait qu'une haute concentration en PGE_2 (~300nM) induit l'expression de la 15-lipoxygénase et dévie donc l'utilisation d'ARA. Cela active

un « shift » de production des eicosanoïdes qui limite la concentration en leucotriènes dans le milieu (pro-inflammatoires) et induit la production de lipoxine A4 (LXA₄, anti-inflammatoire) (Levy et al., 2001). Ce « shift » de production est donc central au processus de transition entre la phase inflammatoire et la phase de résolution. Dans une certaine mesure, une haute concentration de PGD₂ induit également une augmentation modérée de l'expression de la 15-lipoxigénase (Levy et al., 2001). Aussi, il n'est donc pas surprenant que l'inhibition de la signalisation de PGE₂ en début d'inflammation résulte en une réaction inflammatoire déficiente, mais que cette même inhibition en fin de réaction inflammatoire nuit à la résorption de l'inflammation (Nakanishi & Rosenberg, 2013). Il est donc important d'interpréter soigneusement les résultats lorsqu'ils portent sur la PGE₂.

Il existe également un bon nombre d'autres fonctions associées aux prostanoides. Par exemple, la 15d-PGJ₂ est un inducteur de la différenciation des préadipocytes en adipocytes (Mazid et al., 2006) et un puissant activateur du facteur de transcription PPAR γ (Kliwer et al., 1997a). La 15d-PGJ₂ est donc un marqueur important dans le développement du tissu adipeux, mais aussi de la stéatose hépatique dépendant de PPAR γ . Finalement, la PGF_{2 α} est surtout associée aux fonctions reproductives (Makino, Zaragoza, Mitchell, Robertson, & Olson, 2007), mais on lui connaît certains liens aussi avec l'inflammation (Ricciotti & FitzGerald, 2011). Dans l'ensemble, les prostanoides sont toutes plus ou moins reliées à l'inflammation. Cependant, leurs effets dépendent du contexte inflammatoire, de leur niveau d'expression et de l'organe dans lequel elles sont synthétisées.

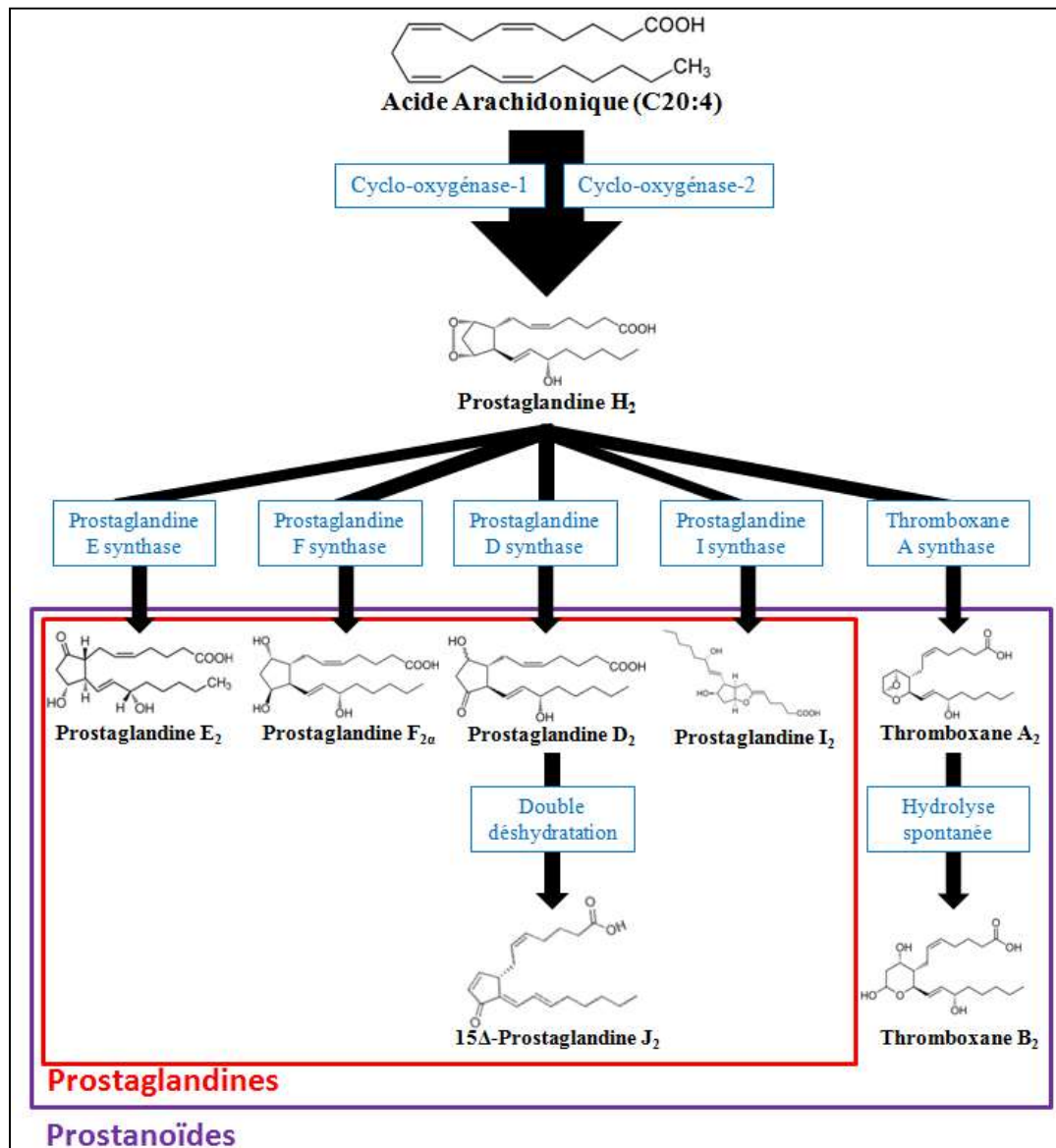


Figure 1.4 : Voie de synthèse des prostanoïdes.

1.1.7.2 Leucotriènes

Les leucotriènes sont une seconde classe de métabolites de l'ARA. Comme les prostanoïdes, les leucotriènes sont également associées à l'inflammation. La synthèse des leucotriènes débute par la présentation de l'ARA à la 5-Lipoxygénase (5-LO) par la FLAP (Five-lipoxygenase-activating protein) (Figure 1.5). La 5-LO ajoute par la suite un groupement hydroperoxyde à l'ARA pour produire la 5-HPETE (5-hydroperoxyeicosatetraenoic acid). La 5-HPETE est ensuite retransformée par la 5-LO pour produire la leucotriène A₄ (LTA₄). La LTA₄ peut ensuite être retransformée par deux enzymes. Alors que la leucotriène A₄ hydrolase convertit la LTA₄ en leucotriène B₄ (LTB₄), la leucotriène C₄ synthase produit la leucotriène C₄ (LTC₄) à partir de cette même LTA₄ et d'une molécule de glutathion. Par la suite, la γ -glutamyltranspeptidase retire un groupement glutamate de la LTC₄ pour produire la leucotriène D₄ (LTD₄). Enfin, des peptidases peuvent retirer une molécule de glycine de la LTD₄ pour produire la leucotriène E₄ (LTE₄) (Murphy & Gijon, 2007; J. N. Sharma & Mohammed, 2006).

Il existe deux classes de leucotriènes divisées selon leur structure et leurs fonctions. Alors que la première classe comprend uniquement la LTB₄, les CysLTs (cystenyl leucotriènes) comprennent les LTC₄, LTD₄ et LTE₄. La LTB₄ est surtout connue pour sa fonction de chimio-attractant et stimule la chemiotaxie, la chémiokinése et l'adhérence des neutrophiles aux cellules endothéliales. Les CysLTs, eux, sont surtout connus pour leur lien avec l'asthme. Les CysLTs sont de puissants bronchoconstricteurs et vasoconstricteurs (J. N. Sharma & Mohammed, 2006).

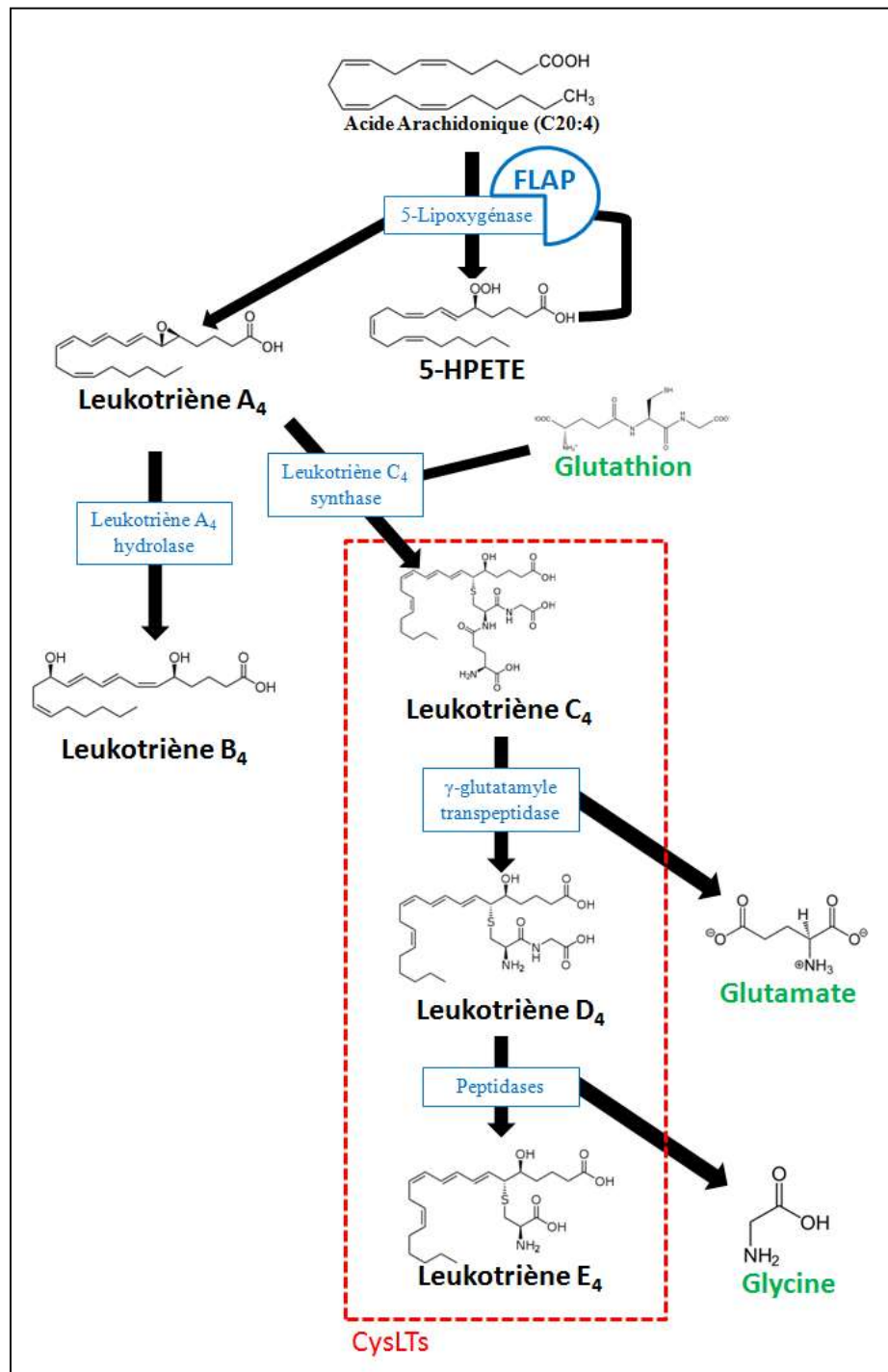


Figure 1.5 : Voie de synthèse des leucotriènes.

1.1.7.3 Lipoxines

Les lipoxines sont également une famille de médiateurs lipidiques dérivés de l'ARA. Cette famille a toutefois la particularité de ne contenir que des molécules ayant un effet anti-inflammatoire. Ces médiateurs sont entre autres connus pour leur puissant effet d'inhibition sur le recrutement des neutrophiles (Levy et al., 2001). Leur synthèse biochimique peut prendre deux voies différentes. La première voie implique d'abord une lipoxygénation, soit la réduction d'un acide gras polyinsaturé par l'addition d'une molécule d'O₂ qui est effectuée sur l'ARA par la 15-LOX (Figure 1.6). Cela résulte en la formation du composé 15(S)-H(p)ETE. Alternativement, l'ARA peut également subir une lipoxygénation par la forme acétylée de COX-2 (point détaillé plus tard) ou par le cytochrome P450, produisant donc le 15(R)-H(p)ETE. Suivant ces deux réactions, une seconde lipoxygénation, cette fois effectuée par la 5-LOX, survient et produit ainsi la lipoxine A₄ à partir du 15(S)-H(p)ETE ou la 15-epi-LXA₄ à partir du 15(R)-H(p)ETE (Figure 1.6) (Chandrasekharan & Sharma-Walia, 2015; Yamamoto, 1999). La seconde voie de synthèse, la voie de synthèse transcellulaire (Figure 1.6), passe d'abord par la production de LTA₄ par la voie des leucotriènes. La LTA₄ subit ensuite une lipoxygénation soit par la 5-LOX ou la 12-LOX, résultant donc en la production de LXA₄ (Chandrasekharan & Sharma-Walia, 2015; Yamamoto, 1999). La littérature est toutefois floue quant à la voie enzymatique exacte qui mène à la production de LXB₄ et de 15-epi-LXB₄. Des recherches doivent encore être menées afin de caractériser ces étapes plus précisément. Il apparaît toutefois que cette voie suit les mêmes étapes initiales menant à la série A des lipoxines.

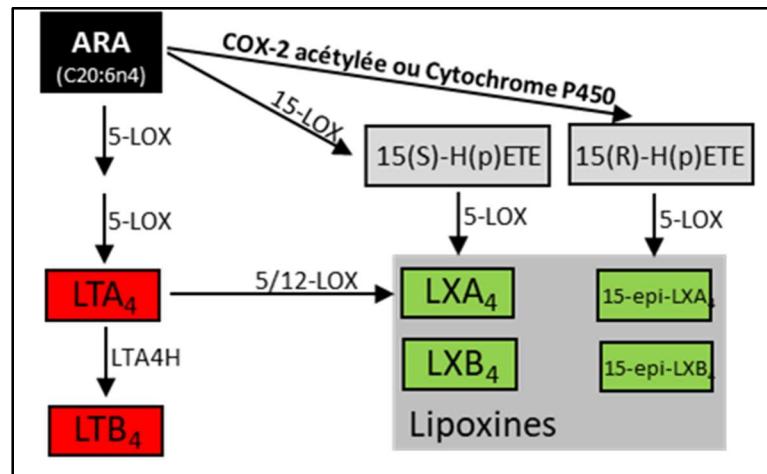


Figure 1.6 : Voies de synthèses de lipoxines. Modifiée de Desmarais *et al.* 2020

1.1.7.4 Isoprostanes et isoprostanes-«like».

Les isoprostanes sont des composés similaires aux prostaglandines par leurs structures chimiques et leur production. La grande différence est que les isoprostanes ne sont pas le résultat direct d'une transformation enzymatique. Quand une accumulation d'espèce réactive d'oxygène (ROS) se produit lors d'un stress oxydatif, l'un des principaux dommages engendrés est la peroxydation des lipides. Or, lorsqu'une molécule d'ARA est attaquée par un radical libre, le résultat est un isoprostane, l'isoprostane G₂ (G₂-IsoP) (Milne, Yin, Hardy, Davies, & Roberts, 2011). En fait, les isoprostanes sont tellement associés au stress oxydatif que l'une des isoprostanes, l'isoprostane F₂ (F₂-IsoP), est utilisée comme marqueur du stress oxydatif (Kaviarasan, Muniandy, Qvist, & Ismail, 2009; Montine et al., 2005). En raison de leur formation essentiellement non enzymatique (il existe cependant certaines exceptions), la voie de synthèse des isoprostanes est extrêmement complexe. Elle ne sera donc pas décrite exhaustivement ici. Comme mentionné précédemment, la F₂-IsoP suscite particulièrement l'intérêt des

chercheurs. Elle est l'une des isoprostanes les plus abondamment produites lors d'un stress oxydatif et elle est fortement associée à l'obésité et à une augmentation du risque de cancer du sein. Sa production, comme celle de la plupart des isoprostanes, débute à même un phospholipide (PC ou PE) renfermant une molécule d'ARA estérifiée. Ainsi, un radical de dihydrogène ($O_2^{\cdot-}$) vient peroxyder l'ARA estérifié pour produire un composé «PGG₂-like » qui est ensuite réduit pour produire une F₂-IsoP (Milne et al., 2011). La libération de la F₂-IsoP est ensuite effectuée par une lipase telle que la PLA₂. La F₂-IsoP peut également subir une isomérisation qui résulte en la création de E₂-IsoP ou de D₂-IsoP qui sont des isomères de PGE₂ et PGD₂. Tout comme leurs isomères, les E₂-IsoP et D₂-IsoP sont liés au contrôle de l'inflammation (Milne et al., 2011). En raison du stress oxydatif produit lors de l'Alzheimer, on retrouve généralement de fortes concentrations d'isoprostanes dans le cerveau des patients (Reich et al., 2001). Finalement, il est possible d'obtenir la 15d-PGJ₂ de deux manières différentes à partir d'une série de modifications non enzymatiques de D₂-IsoP, faisant de la 15d-PGJ₂ un membre des prostaglandines et des isoprostanes (Milne et al., 2011).

1.1.8 Pertinence de l'accumulation d'ARA dans le foie des souris

L'accumulation d'ARA dans le foie des souris transgéniques surexprimant l'ApoD (Labrie et al., 2015) a donc le potentiel de mener à de nombreux déséquilibres dans le métabolisme de lipides, mais aussi dans la balance inflammatoire. La convention générale est qu'une grande accumulation d'acides gras oméga-6 mène généralement à la promotion de l'inflammation en raison du grand nombre de métabolites pro-inflammatoires qui peuvent être générés. Au contraire, une accumulation en oméga-3 serait alors liée à une réduction de l'inflammation en raison de l'abondance des métabolites anti-inflammatoires issues de ces derniers (voir annexe 1). En effet, les trois familles de médiateurs issus des oméga-3, les marésines, protectines et résolvines,

sont exclusivement anti-inflammatoires (Serhan & Levy, 2018). L'absence, jusqu'à présent observée, d'inflammation chez les souris transgéniques hApoD malgré la présence d'une importante stéatose hépatique et d'une accumulation d'ARA est donc surprenante. À ce jour, aucune étude n'a tenté de déterminer si l'ApoD est également capable de lier et de transporter des oméga-3. L'étude de Labrie *et al.* 2015 ne révèle malheureusement pas si ces acides gras sont également accumulés et dans quelle proportion.

Cette donnée pourrait également être très importante dans d'autres contextes. En plus du foie, nous savons également que les souris transgéniques développent une légère stéatose musculaire (Do Carmo, Fournier, et al., 2009). Il n'est pas non plus impossible que l'ApoD puisse affecter d'autres organes chez ces souris. La révélation que l'ApoD permet de moduler le métabolisme et l'inflammation des organes périphériques est donc particulièrement intéressante dans le contexte des maladies inflammatoires chroniques tel que l'obésité. Si l'ApoD permettait de mieux contrôler cette inflammation dans ces contextes, elle représenterait alors potentiellement un outil thérapeutique intéressant. Une perspective d'autant plus intéressante du fait que l'obésité est un enjeu de santé comprenant des coûts humains et monétaires importants et en rapide croissance.

1.2 L'obésité

La proportion d'individus obèses, à travers le monde, ne cesse d'augmenter. Celle-ci a atteint un point où maintenant plus de 39% de la population mondiale peut être considéré en surpoids ou obèse (Chooi, Ding, & Magkos, 2019). Plusieurs pays américains (États-Unis, Brésil, Mexique et Argentine) sont particulièrement concernés

avec une moyenne de 64.2% de leur population en surpoids et 28.3% en condition d'obésité (Chooi et al., 2019).

Bien que l'accumulation excessive de gras dans les tissus adipeux, en particulier lorsqu'elle n'est pas viscérale, ne soit pas en soi un problème de santé majeur, les comorbidités de l'obésité, elles, le sont. L'obésité et en particulier l'accumulation ectopique des graisses, représente donc un grand facteur de risque pour le développement de multiples maladies cardiométaboliques telles que le diabète de type 2, la stéatose hépatique, les problèmes respiratoires, les maladies cardiaques, le cancer et la dépression. Ensemble, ces comorbidités sont les principales responsables de la mortalité des personnes obèses (Gonzalez-Muniesa et al., 2017). La présence de trois facteurs de risques ou plus, tel que l'obésité abdominale, une haute triglycémie, une haute cholestérolémie, une forte pression sanguine et une haute glycémie à jeun est d'ailleurs regroupé sous l'appellation du syndrome métabolique (Sherling, Perumareddi, & Hennekens, 2017).

L'obésité est une maladie multifactorielle qui comprend le regroupement de plusieurs facteurs métaboliques, nutritionnels, génétiques, comportementaux et microbiotiques. La première de ces composantes, la balance énergétique, est un concept assez simple qui repose sur le bilan énergétique de l'individu. Une augmentation de l'activité physique ou une réduction de la quantité de calories ingérées résulte en une balance négative et *vice-versa*. Or, le contenu de la diète de l'individu moyen a substantiellement changé depuis la révolution industrielle et s'est grandement enrichi en sucres simples (Sonnenburg et al., 2016; Varlamov, 2017) et en gras saturés alors qu'elle s'est appauvrie en fibres (Statovci, Aguilera, MacSharry, & Melgar, 2017). En somme, cela se traduit en une diète avec une densité calorique plus élevée. Ce qui veut donc dire que la personne qui consomme cette diète va ingérer une plus grande quantité de calories pour une même quantité (masse) de nourriture. En plus de cela, la diète de

type occidentale (*Western diet*) est également caractérisée par un appauvrissement de plusieurs nutriments ayant des effets bénéfiques comme les polyphénols, des molécules notamment retrouvées dans les pelures de petits fruits (Anhe et al., 2015). De plus, le niveau d'activité physique moyen a grandement diminué pour créer le fameux mode de vie « sédentaire ». En tout, cela représente une situation où la balance énergétique penche largement vers un excès calorique et favorise donc le gain de poids (Hill, Wyatt, & Peters, 2012).

En dehors des calories elles-mêmes, d'autres éléments de la diète influencent également la prise de poids et le développement du syndrome métabolique. La nature des nutriments est également cruciale et est source de multiples effets physiologiques. Une particularité de la diète occidentale est le débalancement du ratio oméga-6/ oméga-3. La diète ancestrale de chasseur-cueilleur avec laquelle l'humain a évolué était caractérisée par un ratio de 2 acides gras oméga-6 pour chaque acide gras oméga-3 (2 :1). Or, la diète occidentale est généralement caractérisée par un ratio allant de 9 :1 à 20 :1 (Simopoulos, 2006, 2016). Tel qu'indiqué plus haut, les oméga-6 et particulièrement l'ARA, sont les précurseurs de multiples médiateurs lipidiques influençant le processus inflammatoire. Or, il existe également un nombre important de médiateurs lipidiques produits à partir des oméga-3.

Alors que la majeure partie des médiateurs lipidiques dérivés des oméga-6 sont pro-inflammatoires, l'ensemble des médiateurs lipidiques connus dérivés des oméga-3 sont anti-inflammatoires. Toutefois, plusieurs enzymes qui permettent la conversion des acides gras oméga en médiateurs lipidiques sont communes aux deux voies de synthèse (Simopoulos, 2016) (voir annexe 1). Cela crée donc une compétition pour la synthèse de ces métabolites. Ce débalancement de la proportion d'oméga-6 vs. -3 dans notre alimentation actuelle est donc plus favorable à la production de médiateurs lipidiques provenant des oméga-6. Cela favorise donc le déclenchement et le maintien de

l'inflammation chronique et donc également la progression des comorbidités associées à l'obésité (Simopoulos, 2016).

Toutefois, ce ne sont pas tous les individus qui se nourrissent avec une alimentation de type occidentale qui deviennent obèses. On retrouve, là, la composante génétique. À ce jour des centaines de gènes sont associés de près ou de loin à l'obésité (Chagnon et al., 2003). Une étude récente recensait que 876 gènes étaient exprimés différemment (438 sur- et 438 autres sous-exprimés) dans l'obésité (Joshi et al., 2021). Le dérèglement de n'importe lequel de ces gènes a le potentiel de produire un effet prolipogénique ou d'influencer le développement des comorbidités de l'obésité. Un bon exemple est représenté chez les souris mutantes *ob/ob* qui ont une mutation du gène permettant la production de la leptine, l'hormone de la satiété. La conséquence de cette mutation est donc un phénotype hyperphagique, le développement rapide de l'obésité, du diabète, en plus de souffrir d'un hypothyroïdisme et d'une thermorégulation affaiblie (Bray & York, 1979; Harris et al., 1998). À l'inverse, une mutation entraînant la perte de fonction d'une enzyme clef du métabolisme de lipides, tel que SCD1 qui catalyse la désaturation du palmitate (C16:0) et du stéarate (C18:0) en palmitoléate (C16:1) et en oléate (C18:1), peut offrir une certaine protection contre l'obésité (Miyazaki et al., 2009) de même que contre les stéatoses hépatiques alcooliques (Lounis et al., 2016) et non alcooliques (Aljohani et al., 2019). Enfin, le microbiote, ou l'écosystème microbien des intestins est un facteur important dans l'homéostasie lipidique et inflammatoire. Par exemple, une diminution de la proportion de certains phylums comme les Bacteroidetes en faveur d'autres phylums comme les Firmicutes est associée à une augmentation de l'absorption énergétique et cause une augmentation de la prise de poids et est associée à de l'inflammation chronique (Baothman, Zamzami, Taher, Abubaker, & Abu-Farha, 2016).

L'obésité, en plus d'être une maladie lipidique, est également une maladie inflammatoire. En effet, l'accroissement du tissu adipeux est fortement corrélé avec l'apparition et l'aggravement de l'inflammation chronique. L'inflammation est ensuite un facteur aggravant qui entraîne des complications comme la résistance à l'insuline systémique et l'athérosclérose (Kanneganti & Dixit, 2012). Bien qu'il existe des liens évidents entre l'ApoD et le métabolisme des lipides, il n'existe encore aucune association claire avec le tissu adipeux. La plupart des études s'étant concentrées sur d'autres tissus dont le foie. Il est toutefois connu que l'expression de l'ApoD est augmentée dans le tissu adipeux blanc et le muscle squelettique, mais pas dans le foie des souris traitées avec des agonistes du facteur de transcription LXR (Hummasti et al., 2004). Il n'est présentement pas connu, chez la souris, à quel point l'expression en ApoD est élevée dans les différents type de tissu adipeux comparativement aux autres tissus (Rassart et al., 2020). Cependant, même si cette expression s'avérait faible, l'association de l'ApoD avec LXR, un facteur de transcription clef du métabolisme lipidique et de la différenciation des adipocytes, indique que l'ApoD pourrait avoir des fonctions importantes dans ces cellules.

1.3 Stéatose hépatique non alcoolique

La stéatose hépatique non alcoolique ou NAFLD (« Non Alcoholic Fatty Liver Disease ») est définie comme une accumulation anormale de lipides dans 5% et plus des hépatocytes, et ce, en absence de facteurs aggravants comme, par exemple, une forte consommation d'alcool (Puneet Puri & Sanyal, 2012). Elle est la forme de maladie hépatique la plus commune avec une prévalence estimée entre 25% et 45% de la population mondiale. Aux États-Unis seulement, on estime que 75 à 100 millions d'individus sont touchés (Rinella, 2015). La NAFLD peut évoluer vers plusieurs stades.

Ainsi, on appelle une stéatose hépatique avec inflammation une stéatohépatite ou NASH (« Non Alcoholic Steatohepatitis »). Celle-ci est réversible, mais peut comprendre l'apparition de gonflement des cellules comme facteur aggravant. Si la stéatose hépatique n'est pas traitée à ce stade, elle peut évoluer en fibrose, puis pire encore, en cirrhose. Finalement, la cirrhose peut donner lieu à une insuffisance hépatique ou peut dégénérer en hépatocarcinome (Rinella, 2015).

Les causes principales de la NAFLD sont une alimentation riche en gras, une prédisposition génétique et un déséquilibre de la flore microbienne intestinale. Elle est donc généralement associée à l'obésité. Une masse de graisse trop importante donne lieu à une lipotoxicité (Kanneganti & Dixit, 2012) qui induit la production de médiateurs pro-inflammatoires qui vont interrompre la signalisation de l'insuline (Agrawal et al., 2016). L'un des principaux producteurs de cytokines pro-inflammatoires, dans ce contexte, est le tissu adipeux omental qui est drainé par la veine porte hépatique (Ibrahim, 2010). L'écoulement de ces cytokines (on peut également les nommer adipokines en raison de leur provenance (Ouchi, Parker, Lugus, & Walsh, 2011)) vers le foie va ensuite être responsable d'une diminution de la sensibilité hépatique, menant à l'hyperinsulinémie et à une altération du métabolisme du glucose. Bien sûr, le danger d'une hyperinsulinémie prolongée est la dégénérescence progressive des îlots pancréatiques bêta (Cerf, 2013). Cela fait donc de la stéatose hépatique (alcoolique ou non) et de l'obésité des facteurs de risque dans le développement du diabète de type 2. Conjointement, une altération proanabolique du métabolisme des lipides et du glucose va inciter le foie à produire et transformer davantage de lipides par la synthèse *de novo* et stimuler l'emmagasiner de ceux-ci. Toutefois, cette accumulation va augmenter la β -oxydation (Cichoz-Lach & Michalak, 2014). Le foie va également augmenter sa production et sécrétion de lipoprotéines (VLDL et LDL) afin d'évacuer ses stocks de lipides (Fon Tacer & Rozman, 2011). Toutefois, cette action mène à une activation délétère de la voie UPR (« unfolded

protein response ») (A. Henkel & Green, 2013). Ensemble, ces mécanismes compensatoires vont respectivement donner lieu au stress oxydatif et au stress du réticulum endoplasmique (RE). Ces stress vont être responsables de dommages cellulaires et du déclenchement de l'inflammation chronique.

L'apparition de l'inflammation signale la transition vers la NASH (Puneet Puri & Sanyal, 2012). L'inflammation chronique du foie va empirer la résistance à l'insuline et accélérer le stockage des lipides. Éventuellement, l'addition de tous ces facteurs néfastes va induire l'apoptose de nombreux hépatocytes. Pire encore, l'activation de l'inflammasome NLRP3 (NOD-, LRR- and pyrin domain-containing protein 3) peut alors mener à la mort cellulaire programmée des hépatocytes par pyroptose. Contrairement à l'apoptose qui n'engendre que peu ou pas de réaction inflammatoire en maintenant le contenu cellulaire dans les corps apoptotiques, le processus de pyroptose relâche volontairement ce contenu dans le milieu extracellulaire. En ce sens, le résultat de ce processus ressemble à celui de la mort cellulaire par nécrose, à la différence que cette mort cellulaire est programmée et due à un bris mécanique. Ce type de mort cellulaire programmée a pour but de perpétuer l'inflammation et est un facteur important dans le maintien de l'inflammation dans la NASH (Yu et al., 2019). Les cellules immunitaires peuvent détecter plusieurs composantes du milieu interne des cellules telles que l'ATP et l'ADN et perpétuer le cycle de production de cytokines pro-inflammatoires et de recrutement de leucocytes à partir de la circulation (Broz & Dixit, 2016). Ces leucocytes vont ensuite envahir et phagocyter les cellules mortes ou en apoptose et sécréter des cytokines pro-inflammatoires comme TNF- α (« Tumor Necrosis Factor- α ») et IL-6 (Interleukine-6) et profibrotiques comme TGF- β (« Transforming Growth Factor- β »). Ensuite, on assiste à l'activation des cellules stellaires hépatiques qui vont produire du collagène afin de cicatrifier l'organe : c'est la fibrose (Pellicoro, Ramachandran, Iredale, & Fallowfield, 2014). Si les causes sous-jacentes de la stéatose ne sont pas adressées, l'organe atteint le point de la cirrhose. Les

critères de diagnostic de la cirrhose suivent habituellement le système de « Child-Pugh-Turcotte » (CPT) ou équivalent. Le CPT qui détermine une note de 5 à 15 dépend de la présence et sévérité d'ascites et d'encéphalopathie hépatique, des niveaux de bilirubine et d'albumine circulante, ainsi que du temps de cicatrisation d'une plaie (Cholongitas et al., 2005). La dérégulation de chacun de ces paramètres est une mesure de la dégénérescence du foie. Éventuellement, l'obtention d'un score de 15 annonce une insuffisance hépatique qui peut entraîner la mort du patient.

L'apparente absence d'inflammation systémique chez les souris transgéniques hApoD est surprenante (Do Carmo, Fournier, et al., 2009). Ce caractère surprenant s'inscrit dans un contexte théorique qui sera exploré ici et représente l'hypothèse principale du développement de la stéatose hépatique et du maintien du climat anti-inflammatoire dans le foie de ces souris.

1.4 PPAR γ , CD36 et l'emballage prolipogénique

PPAR γ est un facteur de transcription essentiel dans la différenciation des adipocytes. Cela a été clairement démontré par l'absence totale de tissus adipeux chez les souris déficientes en PPAR γ (Barak et al., 1999). PPAR γ est un élément intrinsèque et central du métabolisme des lipides, non seulement dans le tissu adipeux, mais également dans le foie. La fonction de PPAR γ est liée à la détection intracellulaire des lipides et de médiateurs lipidiques. On retrouve d'abord PPAR γ dans le cytoplasme où il est en mesure d'interagir avec différents lipides (Umemoto & Fujiki, 2012). Suite à la liaison d'un ligand, PPAR γ va ensuite migrer vers le noyau et s'associer à un récepteur nucléaire RXR (« Retinoid X Receptor »), pour ultimement se lier à une séquence PPRE (« Peroxisome Proliferation Responsive Element ») de ses gènes cibles

(Ahmadian et al., 2013). Il existe un grand nombre de ligands connus de PPAR γ soit naturels ou synthétiques. Parmi ceux-ci, on retrouve entre autres les acides gras insaturés, la PGJ₂ et 15d-PGJ₂ comme ligands naturels, puis les NSAID (« Non Steroidal Anti-Inflammatory Drugs »), et la troglitazone (TZD) comme ligands synthétiques. L'affinité de ces ligands est variable d'un ligand à l'autre (Grygiel-Gorniak, 2014). Ainsi, le ligand naturel ayant la plus forte efficacité d'activation sur PPAR γ est le 15d-PGJ₂, un des métabolites de l'ARA. L'ARA lui-même a déjà été associé à l'activation de PPAR γ , mais cette activité semble être attribuable à ses métabolites et non à son action directe. Les tests de transactivation de PPAR γ révèlent que l'addition d'ARA produit une activité de transactivation deux fois plus grande à l'acide linoléique (son précurseur), mais dix fois inférieure à celle du 15d-PGJ₂ (Kliwer et al., 1997a). En absence d'une étude de transactivation de PPAR γ inhibant spécifiquement les voies de synthèses permettant le métabolisme de l'ARA, il n'est pas possible d'exclure totalement l'ARA et l'acide linoléique comme ligands de PPAR γ . Par contre, à des concentrations physiologiques, la seule molécule de cette voie ayant la capacité potentielle d'induire l'activation de PPAR γ est le 15d-PGJ₂ (Varga, Czimmerer, & Nagy, 2011).

Après liaison à un PPRE, PPAR γ permet d'activer la transcription de ses gènes cibles. Dans le contexte présent, on s'intéresse surtout à ses cibles dans le foie. Ainsi, l'activation de PPAR γ résulte en une augmentation de l'expression de CD36 (« cluster of differentiation 36 »). La protéine CD36 (aussi connue sous le nom de « fatty acid translocase » ou FAT) est particulièrement importante dans le contexte hépatique, car elle est impliquée dans la captation de lipides extracellulaires. Située à la surface de la membrane cellulaire, elle permet la captation d'acides gras à longues chaînes et de LDL oxydées (Endemann et al., 1993). CD36 est donc fortement associée à la NAFLD. Aussi, l'inactivation génétique de CD36, spécifiquement dans le foie, de souris soumises à une diète riche en gras diminue grandement le contenu lipidique du foie de

ces dernières (Wilson et al., 2016). L'effet pervers de la voie PPAR γ – CD36 est qu'elle s'autoactive. L'activation de PPAR γ mène à une augmentation de l'expression de CD36 qui mène à son tour à une augmentation de l'entrée de lipides capables d'activer PPAR γ . Ce mécanisme peut donc mener à un emballement prolipogénique.

Chez nos souris transgéniques hApoD, l'activation de PPAR γ , l'expression de CD36 et conséquemment la captation d'oléate sont augmentées à 12 mois. Ce déséquilibre représente un élément important menant à la stéatose hépatique (Labrie et al., 2015). Il reste toutefois à déterminer si l'activation de PPAR γ dans le foie des souris transgéniques est associée à une modulation de la production des prostaglandines, en particulier au 15d-PGJ₂ ou à d'autres métabolites dérivés de la PGD₂.

1.5 SREBP-1s et interactions avec l'ARA.

Au même titre que PPAR γ , SREBP-1 (« Sterol regulatory element binding protein-1 ») est considéré comme un facteur de transcription clef du métabolisme de lipides. Alors que PPAR γ va surtout affecter le stockage d'acides gras, SREBP-1 va augmenter la synthèse de lipides. Il existe deux isoformes de SREBP-1, soit SREBP-1a et SREBP-1c (Eberle, Hegarty, Bossard, Ferre, & Foufelle, 2004), transcrits à partir du même gène, *SREBF1*. Les SREBP-1s ont des efficacités transcriptionnelles et des patrons d'expression différents. L'expression de SREBP-1c est particulièrement forte dans le tissu adipeux blanc et dans le foie, alors que l'expression de SREBP-1a est forte dans la rate et les intestins (Eberle et al., 2004). SREBP-1c est donc plus pertinent dans un contexte hépatique. SREBP-1, pour effectuer sa fonction de facteur de transcription, doit d'abord être activé. Sous sa forme inactive, SREBP-1 est retenu à la surface du réticulum endoplasmique (RE) en association avec la protéine SCAP (« SREBP clivage

activating protein »). Suite à l'activation de SCAP, le complexe va migrer vers le Golgi où deux protéases, S1P (« site 1 protease ») et S2P (« site 2 protease ») vont cliver SREBP-1 pour relâcher la protéine mature nSREBP-1 (SREBP-1 nucléaire). nSREBP-1 va ensuite migrer vers le noyau, où il va induire la transcription de ses gènes cibles (Eberle et al., 2004). Dans le cas de nSREBP-1c hépatique, on assistera donc à une activation de la transcription des gènes *SREBF1*, *ACLY* (*ATP citrate lyase*), *ACACA* (*Acetyl-CoA carboxylase*), *FASN* (*Fatty acid synthase*) et *SCD1* (*Stearoyl-CoA desaturase-1*) qui sont des gènes clefs dans la synthèse des lipides ou lipogenèse (Y. Wang, Viscarra, Kim, & Sul, 2015).

La régulation de SREBP-1c se fait à trois niveaux, soit le contrôle de sa transcription, de son activation par clivage et finalement par des modifications post-traductionnelles de la forme mature (nSREBP-1c). Dans un premier temps, la transcription de SREBP-1c à partir de *SREBF1*, est augmentée par l'insuline à travers la voie PI(3)-kinase et par l'activation de LXR α (« Liver X Receptor α »), un récepteur hormonal nucléaire sensible au cholestérol (Eberle et al., 2004). Cependant, l'insuline maintient sa capacité d'activer la transcription et le clivage de SREBP-1c même chez des souris présentant une résistance à l'insuline (Horton, Goldstein, & Brown, 2002). L'hyperinsulinémie de ces souris contribuerait donc à la production hépatique de lipides. L'activation de la transcription de SREBP-1c peut également être réduite par des acides gras insaturés. Ceux-ci bloquent compétitivement l'activation de LXR α en servant d'antagonistes à ses ligands (Horton et al., 2002). Parmi ces acides gras, il semble que l'ARA et du DHA (« Docosahexaenoic acid »), soient de forts antagonistes de LXR α . En effet, la délétion de *ELOVL5* (« Elongation of Very Long fatty acid chain 5 »), une élongase importante dans la synthèse de l'ARA et du DHA, induit une surexpression de SREBP-1c menant au développement d'une stéatose hépatique chez la souris. Celle-ci serait due à l'insuffisance en ARA et en DHA. Aussi, la supplémentation de la diète par ces deux composés normalise le contenu lipidique hépatique chez ces souris et diminue

l'expression des cibles transcriptionnelles de SREBP-1c (Moon, Hammer, & Horton, 2009). SREBP-1 est donc un élément crucial du métabolisme des lipides. En fait, selon certains, il serait même essentiel au développement de la stéatose hépatique. La délétion de SREBP-1c spécifiquement dans le foie de souris *ob/ob* (déficientes en leptine et donc hyperphagiques) inhibe entièrement l'accumulation lipidique dans le foie (Moon et al., 2012).

1.6 Cytokines et polarisation M1/M2 dans un contexte hépatique

L'inflammation et le métabolisme des lipides sont intimement liés. Il est généralement accepté que l'inflammation chronique observée chez les individus obèses est d'abord causée directement et indirectement par une accumulation excessive de lipides. Cette inflammation devient alors un facteur aggravant de la pathologie à travers son effet inhibiteur de la signalisation de l'insuline. Cela représente le dogme du « two hits theory » (Gentile & Pagliassotti, 2008). Bien qu'atypique, l'inverse est également possible. Si une inflammation chronique se déclenche dans un organe comme le tissu adipeux ou le foie, elle peut engendrer une accumulation lipidique (Ma et al., 2015). Ce processus est dirigé par une balance inflammatoire opposant des cytokines pro- et anti-inflammatoires. Ce balancier va ensuite déterminer le type d'action et de phénotype adopté par les cellules immunitaires locales et potentiellement inciter l'envahissement de l'organe par les monocytes et les neutrophiles provenant de la circulation. L'adoption de ce phénotype résultant d'une stimulation par les chimiokines est communément appelée polarisation. Lorsqu'un macrophage passe du statut inactivé (M0) à un statut activé, il adopte alors un phénotype appartenant soit à une polarisation

M1 pro-inflammatoire ou M2 anti-inflammatoire. Il faut toutefois comprendre que cette polarisation représente bien ici une programmation phénotypique des cellules et non une population cellulaire distincte. Il ne s'agit donc pas d'une différenciation cellulaire à proprement parler puisque ces polarisations sont réversibles (Davis et al., 2013). Cet attribut explique donc simplement la grande plasticité phénotypique des macrophages.

La polarisation M1, ou polarisation classique, est un état pro-inflammatoire dans lequel les macrophages vont sécréter des cytokines également pro-inflammatoires comme le TNF- α , et les interleukines IL-1, IL-6, IL-12 et IL-23 afin de perpétuer la réaction inflammatoire (K. Y. Lee, 2019). Dans cet état particulier, les macrophages vont être dans un état favorisant leur capacité à phagocyter les pathogènes et produire des réactifs microbicides et tumoricides tel que l'oxyde nitrique ou autres ROS (K. Y. Lee, 2019) et vont être associés à la destruction tissulaire (Novak & Koh, 2013). En contrepartie, les macrophages à polarisation M1 ont une capacité réduite en efferocytose, la phagocytose des corps apoptotiques (Korns, Frasch, Fernandez-Boyanapalli, Henson, & Bratton, 2011).

À l'inverse, la polarisation M2, ou polarisation alternative, est un état anti-inflammatoire poussant les macrophages à sécréter des cytokines anti-inflammatoires comme l'IL-10 et TGF- β et à participer à l'homéostasie ainsi qu'au remodelage et à la réparation des tissus (K. Y. Lee, 2019). Ces macrophages de type M2 vont également avoir une meilleure capacité d'efferocytose. De plus, ils sont caractérisés par une plus forte expression et/ou activité du facteur de transcription PPAR γ (Korns et al., 2011). PPAR γ est d'ailleurs considéré par certains comme étant un régulateur clef de la polarisation des macrophages (Luo, Xu, Wang, Wu, & Hua, 2017). Ces états d'activation sont analogues à ceux observés dans les cellules T (polarisation Th1 et Th2) et comme pour celles-ci, certaines cytokines sont responsables et/ou découlent de

ces dernières. Il existe trois sous-types de polarisation M2, soit M2a, M2b et M2c. Celles-ci ont toutes leurs caractéristiques distinctes, mais dans un contexte hépatique anti-inflammatoire, la plus intéressante est la polarisation M2c (Y. Y. Sun et al., 2017) en raison de la désactivation de la transcription des gènes pro-inflammatoires M1 en plus de l'activation des voies de réparation tissulaire (Roszer, 2015).

Après la différenciation des monocytes en macrophages hépatiques non polarisés (M0), les cytokines présentes dans le milieu vont déterminer le devenir des macrophages. Une stimulation par $\text{INF-}\gamma$, $\text{TNF-}\alpha$ ou des lipopolysaccharides (LPS) va induire la polarisation M1. Ces macrophages vont ensuite sécréter $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, IL-6 et iNOS (entre autres) et promouvoir une réaction inflammatoire Th1. Au contraire, une stimulation par IL-10 ou $\text{TGF-}\beta$ va induire une polarisation M2c. Celle-ci va inciter les macrophages à sécréter IL-10 et $\text{TGF-}\beta$ (Y. Y. Sun et al., 2017). Cela aura comme conséquence de réprimer l'inflammation et de promouvoir la réparation tissulaire. Le foie offre cependant une complexification supplémentaire, puisqu'il dispose de son propre stock de macrophages résidents : les cellules Kupffer (KCs, Kupffer Cells). Les KCs dérivent de cellules progénitrices du foie fœtal et sont dotées d'une capacité d'autoréplication. Elles ne sont donc pas dépendantes d'un renouvellement par les monocytes sanguins. Une particularité supplémentaire est qu'elles sont moins sensibles aux stimuli pro-inflammatoires comme le LPS. Cela dérive de l'évolution d'une certaine « tolérance » envers les substances immuno-réactives en provenance de l'alimentation, sans laquelle il y aurait une réaction inflammatoire non désirée (Dixon, Barnes, Tang, Pritchard, & Nagy, 2013). Or, l'un des rôles des KCs est justement de filtrer ces molécules immuno-réactives avant qu'elles n'atteignent la circulation sanguine où elles pourraient causer une réaction inflammatoire. En condition normale, les KCs sont donc fortement ancrées dans une polarisation M2. Toutefois, si une stimulation pro-inflammatoire suffisamment forte et continue est exercée, la polarisation des KCs peut changer vers la polarisation M1. Une exposition à long terme

à une diète riche en gras peut par exemple mener à un tel changement dans la polarisation des KCs (Luo et al., 2017). Cet effet est en particulier lié à un effet des acides gras saturés, alors que les acides oméga-3 orientent les KCs vers une polarisation M2 (Luo et al., 2017). Les cytokines produites par les KCs en polarisation M1 vont recruter des monocytes sanguins qui vont également adopter une polarisation M1, augmentant grandement le stock de cellules M1. Si ce débalancement est maintenu assez longtemps, il y aura ensuite des dommages tissulaires « collatéraux ». Ces dommages contribueront alors au maintien de la polarisation M1 et à l'inflammation chronique. Toutefois, si les causes initiales de l'inflammation sont résolues ou si une pression anti-inflammatoire externe est appliquée, on peut assister à la résorption de l'inflammation et au retour à la polarisation M2. À ce moment, la phase de réparation tissulaire caractéristique de la polarisation M2c entrera en jeu, accompagnée d'une forte sécrétion de TGF- β . Comme la stéatose hépatique des souris hApoD est, au moins potentiellement issue d'une dérégulation des mécanismes inflammatoires (accumulation d'ARA), il est donc très probable qu'il y ait une modulation de la polarisation des macrophages chez ces souris. Toutefois, considérant la haute expression de PPAR γ dans le foie des animaux transgéniques, il ne serait pas étonnant que les médiateurs lipidiques produits à partir de l'ARA soient des agonistes de ce facteur de transcription. Cela aiderait donc le foie à maintenir ses macrophages résidents dans une polarisation M2. Cela, si bien sûr l'activation de PPAR γ se produit également dans les macrophages en question.

1.7 Les barrières du SNC

Comme mentionné précédemment, chez la souris, l'ApoD est une protéine essentiellement neurale. Toutefois, il y a une forte concentration d'ApoD sanguine chez

les souris hApoD exprimant l'ApoD humaine sous le promoteur neuronal Thy-1 (Do Carmo, Fournier, et al., 2009). Cela a amené à croire qu'elle serait en mesure de quitter le SNC pour rejoindre la circulation sanguine. Toutefois, comme le SNC est isolé du reste du corps par plusieurs barrières (Figure 1.7), il n'était pas garanti que ce processus ait lieu. Le contenu protéique libéré dans le liquide cébrospinal (*cerebrospinal fluid*, CSF) peut uniquement quitter le SNC par deux grandes voies, soit en étant drainé avec le CSF dans la lymphe et éventuellement dans le sang ou en passant à travers l'une des barrières du cerveau pour atteindre la circulation sanguine. Or, il existerait certainement un avantage à ce que l'ApoD puisse quitter rapidement le SNC si elle venait à être chargée de lipides toxiques comme l'ARA suite à leur relâchement lors de dommages neurologiques. Il y aurait donc possiblement un avantage évolutif à développer une mécanisme de transport de l'ApoD à travers l'une de ces barrières afin d'évacuer efficacement ces ligands lorsqu'ils sont libérés brusquement des membranes cellulaires dans le SNC.

Ici, nous détaillerons les principales caractéristiques de ces barrières. Dans un premier temps, la barrière hématoencéphalique (BHE) ou barrière sang-cerveau (en « blood-brain barrier », BBB) est un regroupement de 3 types de cellules formant une « gaine » autour des vaisseaux sanguins. Dans l'ordre du sang vers le tissu neural, on retrouve donc une couche de cellules endothéliales formant la barrière physique et métabolique de la BBB, puis on retrouve de nombreux pericytes et des pieds d'astrocytes qui offrent des fonctions de support et de maintien de la barrière physique (Redzic, 2011). Cette barrière permet donc de filtrer les composants sanguins qui vont atteindre le SNC et d'empêcher l'entrée de molécules néfastes au SNC en plus d'offrir une protection contre les fluctuations du contenu sanguin. La BCSFB (« blood-CSF barrier ») quant à elle, se retrouve à la surface des plexus choroïdes à l'interface des ventricules cérébraux et du système sanguin (Redzic, 2011). Elle est composée d'une simple couche de cellules épithéliales cuboïdes faisant face au CSF et d'un arrangement désorganisé et

hautement vascularisé de tissu conjonctif. Une présence importante de jonctions serrées entre les cellules épithéliales est à la source des propriétés de barrière de la BCSFB (Strazielle & Gherzi-Egea, 2013). Enfin, nous retrouvons la barrière arachnoïde qui représente la barrière externe contenant le CSF à l'intérieur de l'espace subarachnoïdien. Cette barrière recouvre la surface externe du cerveau et de la moelle épinière (Weller, Sharp, Christodoulides, Carare, & Mollgard, 2018). La barrière arachnoïde est composée de cellules leptoméningées densément compressées et jointes ensemble par des desmosomes. Elle sépare les vaisseaux sanguins fenestrés de la dure-mère du CSF qui s'écoule dans l'espace subarachnoïdien (Weller et al., 2018). Le passage de protéines à travers ces barrières, en particulier à travers la BBB et la BCSFB, s'effectue donc par le biais de transcytose et dépend de récepteurs présents à la surface des cellules endothéliales. De tels mécanismes de transcytose sont déjà connus pour plusieurs protéines comme l'insuline (Woods, Seeley, Baskin, & Schwartz, 2003), la transferrine, la leptine et certaines cytokines (Redzic, 2011).

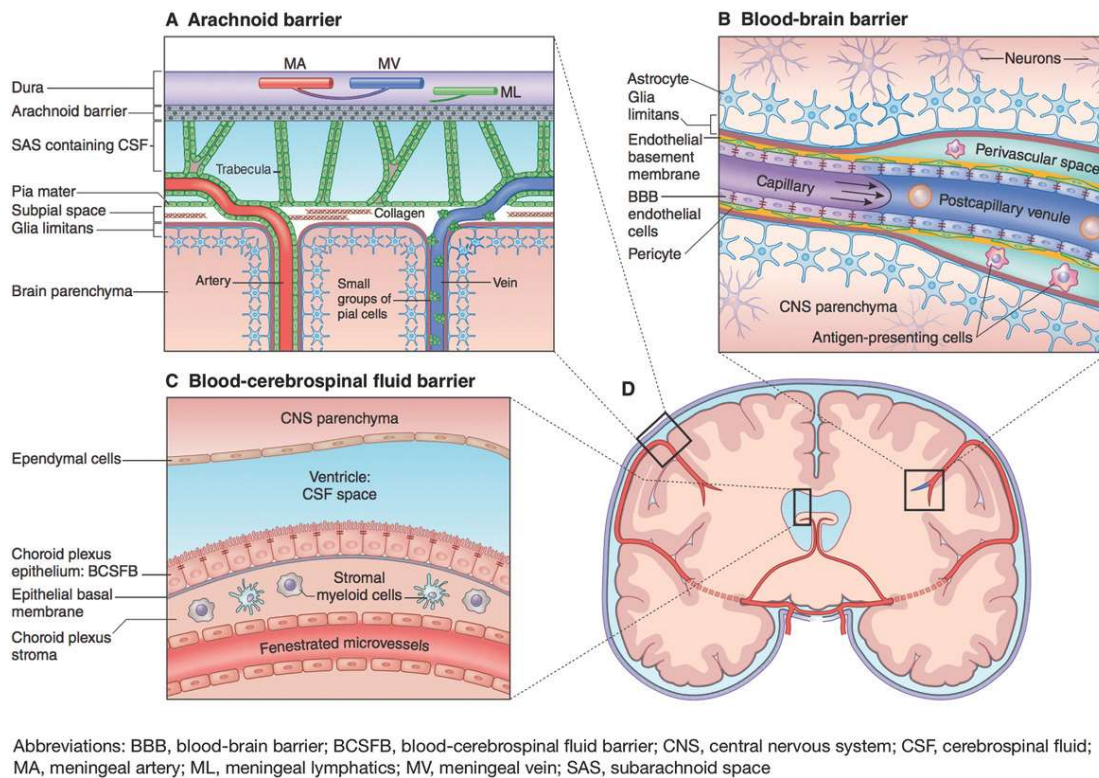


Figure 1.7 : Schématisation des barrières du SNC humain. Tirée de (Furtado et al., 2018)

Toutefois, les voies de passage de ces protéines à travers les barrières du cerveau sont surtout caractérisées du sang vers le cerveau et pas nécessairement dans le sens inverse. Cet engouement pour ces mécanismes est particulièrement dérivé de l'intention d'acheminer des composés chimiques jusqu'au cerveau à des fins de traitements comme pour traiter les tumeurs au cerveau. Afin de bien comprendre la dynamique de la sortie d'une protéine du cerveau, il nous faut également comprendre les systèmes d'évacuation des déchets en dehors du cerveau et donc le système de drainage du CSF.

1.8 Drainage lymphatique du cerveau

Le cerveau est le siège d'une activité métabolique et catabolique considérable. Il a donc forcément besoin d'un système d'évacuation des déchets métaboliques robuste. Cependant, le SNC ne possède pas, d'un simple système de drainage lymphatique comme les autres organes. Dans le reste du corps, le système lymphatique est composé d'un large réseau tentaculaire de fins capillaires dont l'une des extrémités est fermée et dont l'autre extrémité est drainée dans de plus larges vaisseaux acheminant les déchets métaboliques, les fluides et les protéines du liquide interstitiel entourant les organes et tissus pour éventuellement aboutir dans le système veineux (B. L. Sun et al., 2018). Le système lymphatique est essentiel au maintien de la balance entre l'eau et les solutés, l'homéostasie, le métabolisme et l'immunité (Liao & von der Weid, 2015). Le cerveau, puisqu'il doit rester isoler du reste de la circulation afin de maintenir un niveau constant et spécifique de solutés et cela avec un minimum d'intervention des cellules immunitaires périphériques, possède un système de drainage bien particulier et très complexe séparé en plusieurs systèmes distincts. Dans ce dernier, le liquide interstitiel est plutôt drainé dans le CSF. Le CSF est initialement produit par le plexus choroïde, à un rythme de 300 à 1000 ml/jour chez l'homme adulte, et s'écoule d'abord dans les ventricules cérébraux. Sa concentration en soluté étant faible, le CSF agit alors comme un réservoir collecteur des déchets métaboliques en créant un gradient de concentration entraînant les solutés du liquide interstitiel jusqu'au CSF (J. L. Thomas, Jacob, & Boisserand, 2019).

Le CSF progresse ensuite vers l'espace subarachnoïdien (Figure 1.8 et 1.9). De là, le CSF s'écoule soit vers le bas, autour de la moelle épinière ou vers le haut dans les cavités cérébrales où il est absorbé par les granulations arachnoïdes et les villosités arachnoïdales de chaque côté du sinus sagittal supérieur (Bradley, 2015). Le CSF peut

alors enfin être drainé dans le système veineux où il se mêle à la circulation (figure 1.8) (Letchuman & Donohoe, 2020).

Circulation du CSF

- Le CSF est produit à partir du sang et est retourné au sang
- Les CSF passe de l'espace subarachnoïdien aux sinus duraux via les villosités arachnoïde

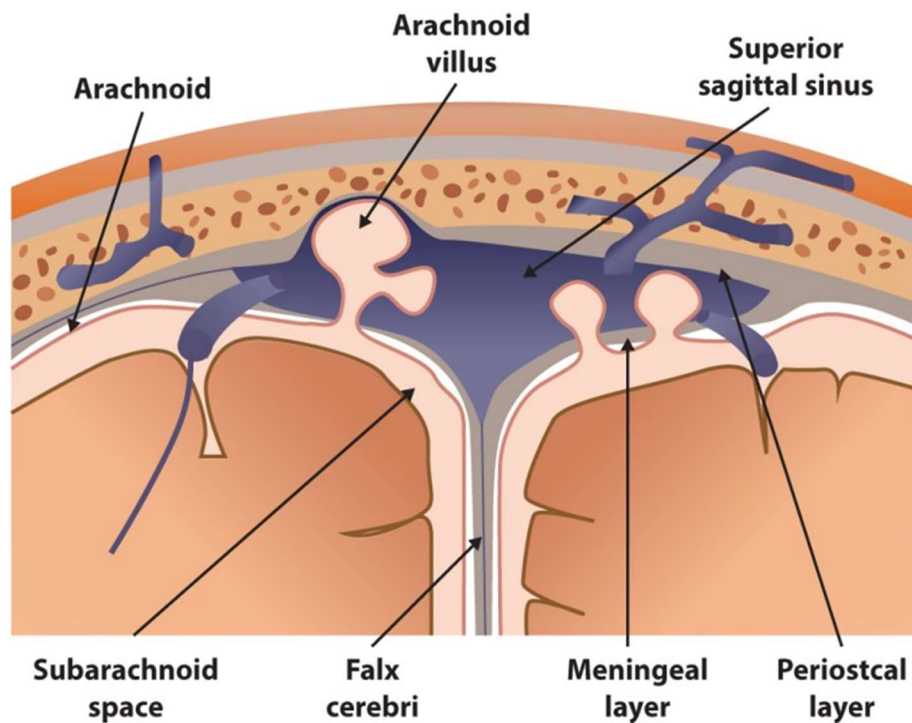


Figure 1.8 : Drainage du CSF dans le sinus sagittal supérieur et le système veineux. Image modifiée de Letchuman & Donohoe, 2020.

En plus de s'écouler vers le sinus sagittal supérieur, le CSF peut également être drainé dans les espaces périvasculaires par le système glymphatique. Ce système est l'une des voies majeures de sortie du CSF. Les espaces périvasculaires sont les espaces retrouvés entre la paroi externe des vaisseaux sanguins cérébraux et la membrane basale du

cerveau. Ils sont également nommés espace de Virchow-Robin (J. L. Thomas et al., 2019). Le CSF peut donc également quitter les ventricules cérébraux, traverser le parenchyme cérébral et entrer l'espace périvasculaire à travers des pores spécialisés (Figure 1.9). Les astrocytes jouent un grand rôle dans ce processus. Les pieds des astrocytes sont riches en aquaporine 4 (AQP4) et aident à diriger le gradient de pression hydrique vers ces pores et entrer dans les espaces périvasculaires. Les astrocytes participent également à la création du gradient de pression qui pousse les fluides des espaces périartériels vers et à travers le parenchyme (J. L. Thomas et al., 2019) (Figure 1.9).

En plus de ces systèmes s'ajoute le drainage lymphatique olfactif/cervical. Le CSF peut donc s'écouler dans l'espace subarachnoïdien, puis ensuite, à travers la plaque cribreuse, longer le nerf olfactif pour aller rejoindre les ganglions lymphatiques cervicaux profonds. D'autres vaisseaux collecteurs lymphatiques similaires se trouvent également à la base du cerveau et mènent également à ces ganglions (Figure 1.9).

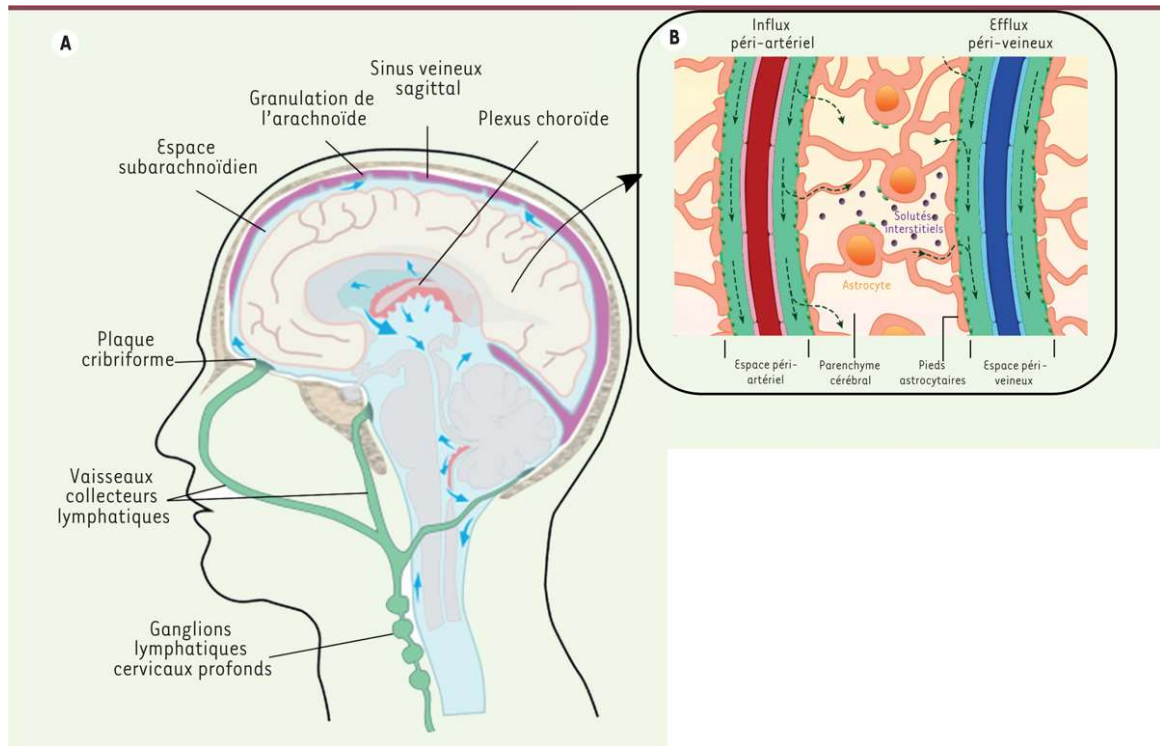


Figure 1.9 : Circulation du CSF et système glymphatique : Image et légende modifiée de (J. L. Thomas, Jacob, & Boisserand, 2019). Le CSF (en bleu) est produit par le plexus choroïde dans les ventricules latéraux et le quatrième ventricule.

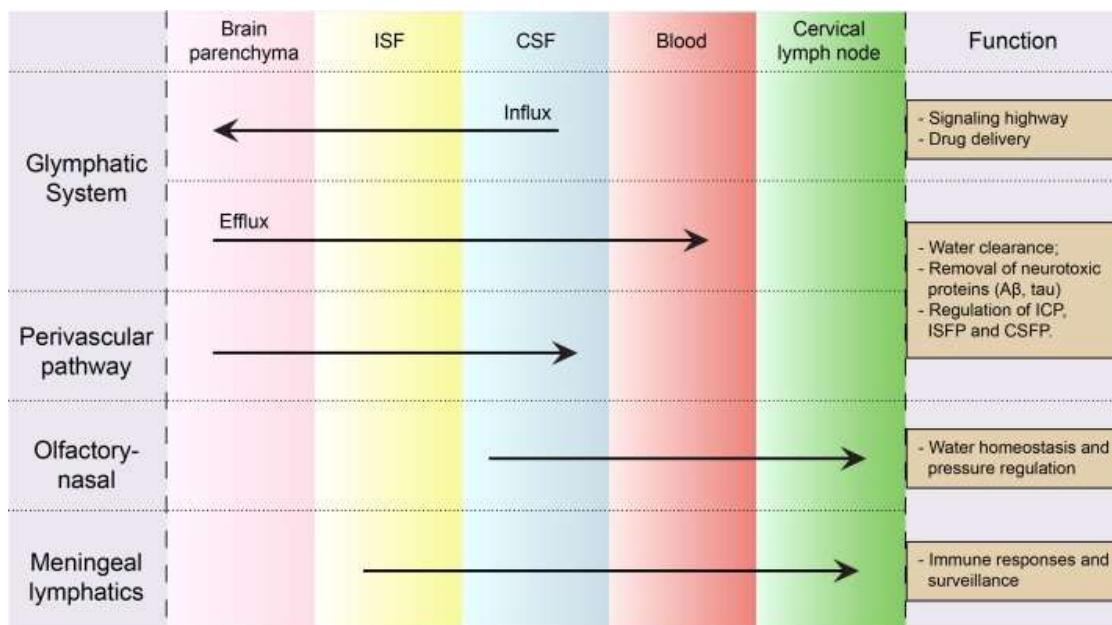


Figure 1.10 : Sélectivité et fonctions complémentaires des systèmes de drainage lymphatiques du cerveau. Image tirée de (B. L. Sun et al., 2018).

Dans l'ensemble, la figure récapitulative 1.10 illustre les fonctions et mouvements des fluides dans laquelle chacun de ces systèmes est impliqué.

Considérant que le liquide interstitiel et le CSF est activement drainé et aboutit éventuellement dans la lymphe et dans le sang, on pourrait penser que l'ApoD produite dans le SNC devrait également atteindre la circulation périphérique. Il incombe toutefois de se demander avec quelle efficacité ce processus est effectué. Les processus exposés plus haut décrivent un processus où les constituants du CSF migrent passivement en suivant les gradients de pression hydrique. Il est toutefois possible que l'ApoD puisse alternativement traverser l'une ou l'autre des barrières du SNC grâce à un transport actif pour atteindre rapidement la circulation sanguine. D'autant plus

intéressant, il serait important de déterminer quels tissus sont ciblés par l'ApoD à sa sortie du cerveau et déterminer quels pourraient être les impacts sur le métabolisme.

Dans les maladies neurodégénératives, l'ApoD est surexprimée sur une très longue période de temps (Rassart et al., 2020), il y a donc là un fort potentiel pour que cet ApoD qui atteint ensuite la circulation influence des processus métaboliques et inflammatoires dans ces autres structures. Considérant les stéatoses hépatique et musculaire décrites précédemment (Do Carmo, Fournier, et al., 2009), il va donc sans dire que l'on s'attendrait à ce que ces deux tissus soient d'importantes cibles de l'ApoD.

1.9 La basigine (CD147)

Les travaux de notre groupe de recherche ont précédemment démontré que l'ApoD est une protéine qui, une fois sécrétée, peut être recaptée et internalisée par les cellules en plus d'effectuer des translocations nucléaires en fonction de certains stress (Do Carmo et al., 2007). Sous ces conditions, il semblait d'ailleurs que l'ApoD nucléaire soit dérivée de l'ApoD sécrétée et donc qu'elle agisse en tant que transporteur de ligand extracellulaire (Do Carmo et al., 2007). Ce mécanisme de sécrétion, captation et réabsorption de l'ApoD nécessite toutefois l'existence d'un récepteur inconnu à l'époque. Des travaux plus récents ont identifié un tel récepteur chez les cellules 293T (épithéliales) et SH-SY5Y (neuroblastomes). Il a été démontré que la basigine (BSG, CD147 ou EMMPRIN) une protéine multifonctionnelle transmembranaire glycosylée régule la captation d'ApoD extracellulaire (Najyb, Brissette, & Rassart, 2015). Or, la BSG est exprimée par les cellules endothéliales de la BBB (Zuchero et al., 2016). Ces données soulignent la possibilité d'un mécanisme de transcytose de l'ApoD à travers la BBB ou la BCSFB.

La BSG est un récepteur exprimé dans un grand nombre de tissus, notamment à la surface des hépatocytes dans le foie chez l'humain (Uhlen et al., 2015a) (données disponibles au <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000172270-BSG/tissue>) (figure 1.11) et chez la souris (Calabro et al., 2014). Il va donc sans dire que, si l'ApoD intacte quitte effectivement le SNC pour ensuite être internalisée dans le foie, l'on s'attendrait donc à ce que la BSG soit impliquée dans ce processus.

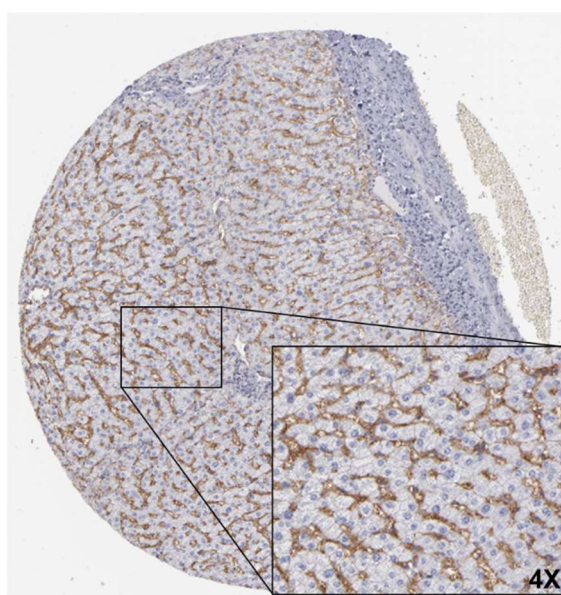


Figure 1.11 : Révélation immunohistochimique de la BSG sur une biopsie hépatique humaine. Image modifiée de (Uhlen et al., 2015a) (image originale disponible au <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000172270-BSG/tissue>). Noyaux colorés en bleu et coloration immunohistochimique de la BSG en brun.

1.10 Objectifs et hypothèses

L'étude de la littérature concernant l'ApoD révèle plusieurs manques quant à la compréhension des propriétés et des fonctions de l'ApoD. Les chapitres qui suivent seront donc dédiés à explorer trois grands axes de recherches tentants de répondre à quelques-uns de ces questionnements. Ces objectifs et les hypothèses spécifiques qui y sont liées sont exposés ici.

Objectif 1: Déterminer si l'ApoD est liée à la santé métabolique chez l'humain.

En particulier, l'objectif de ce chapitre sera de déterminer si l'expression en ApoD (ARNm) ou même son accumulation (protéine) dans les tissus adipeux de personnes obèses est positivement corrélée avec des paramètres de santé métabolique.

Hypothèse 1.1 : Connaissant les effets bénéfiques de l'ApoD sur la résorption de l'inflammation et sur le stress oxydatif, on s'attend à ce que la concentration en cytokines inflammatoires circulantes soit inversement corrélée avec les niveaux d'ApoD.

Hypothèse 1.2 : Sachant que plusieurs cytokines inflammatoires ont des effets inhibiteurs sur la sensibilité à l'insuline, on pourrait s'attendre à ce que des hauts niveaux d'ApoD soient associés à une insulïnémie et une glycémie plus faible, ainsi qu'à de meilleurs index des sensibilités à l'insuline.

Objectif 2 : Éclaircir les mécanismes physiologiques responsables du développement de la stéatose hépatique non-inflammatoire des souris Thy1-hApoD.

Plusieurs informations clefs nous sont présentement inconnues quant au développement et au statut métabolique et inflammatoire de la stéatose hépatique qui s'établit chez les souris Thy1-hApoD. En particulier, avant le lancement de ce projet, nous ne possédions des données sur l'état métabolique et inflammatoire des souris transgéniques qu'à l'âge de 12 mois. Or, il serait indispensable d'obtenir des données plus précoces afin de mieux comprendre la chronologie d'événements qui mènent au développement de la pathologie. Aussi, les données sur le statut inflammatoire des souris sont incomplètes. Nous ne disposions alors que des concentrations circulantes de plusieurs cytokines à l'âge de douze mois. Il serait beaucoup plus pertinent de mesurer le statut inflammatoire directement dans le foie et d'étendre le nombre de biomarqueurs étudiés en prenant en compte la notion de polarisation inflammatoire. Enfin, il serait intéressant de déterminer la nature des lipides accumulés dans le foie, puisque seuls les niveaux d'ARA ont été mesurés jusqu'à présent.

Hypothèse 2.1 : Il est fort probable que des déséquilibres métaboliques surviennent plusieurs mois avant même que la stéatose ne soit visiblement établie. Sachant que l'accumulation lipidique, mais pas la synthèse lipidique *de novo*, a précédemment été incriminé, c'est cette voie cellulaire en particulier que l'on s'attend à voir augmentée précocement. En particulier, on s'attend à mesurer une augmentation de l'activation de PPAR γ et la surexpression de CD36 dans le foie bien avant l'établissement de la stéatose hépatique.

Hypothèse 2.2 : Le statut inflammatoire varie probablement en fonction de l'âge. Sachant que l'ARA est accumulé dans l'organe, il est probable que le foie passe par une phase anti-inflammatoire avant de se stabiliser.

Hypothèse 2.3 : L'ARA accumulé dans le foie est probablement converti en divers eicosanoïdes. Si une phase pro-inflammatoire survient, elle est probablement médiée par la production d'eicosanoïdes pro-inflammatoires tels que PGE₂, PGF_{2α} et les leucotriènes. En contrepartie, la transformation de l'ARA en eicosanoïdes anti-inflammatoires est probablement un des mécanismes permettant de maintenir un statut inflammatoire neutre ou anti-inflammatoire dans l'organe. En particulier, la série D (incluent aussi les J) des prostaglandines est probablement impliquée. En particulier, la 15d-PGJ₂ est un inhibiteur de la signalisation de NF-κB et un puissant activateur de PPARγ. Elle est donc fort probablement impliquée.

Hypothèse 2.4 : L'accumulation spécifiquement d'ARA dans le foie est un paramètre qui diverge beaucoup des autres stéatoses hépatiques où se sont surtout des acides gras saturés et mon-insaturés à chaînes longues qui sont accumulées. Il est donc fort probable que le profil lipidique complet du foie des souris transgéniques soient fort différent de celui des souris sauvages et diverge du profil normal d'un foie stéatosé. Ces différences pourraient aider à expliquer l'absence d'inflammation.

Objectif 3 : Déterminer si l'ApoD est effectivement capable de quitter activement le cerveau des souris afin d'atteindre le foie et d'autres organes métaboliques.

Bien que hautement probable, nous n'avons aucune preuve que l'ApoD produite dans le cerveau pouvait atteindre le foie et être la cause de la stéatose hépatique des souris transgéniques Thy1-hApoD. La présence de multiples barrières physiques isole le SNC de la circulation sanguine et limite le passage des macromolécules vers et en dehors du cerveau. Par conséquent, il était nécessaire de formellement démontrer cela.

Hypothèse 3.1 : Une injection intracérébroventriculaire d'ApoD radiomarquée devrait résulter en la découverte de radioactivité en dehors du cerveau. Cela devrait être contrasté par une faible ou inexistante quantité de radioactivité périphérique lors de similaires injections, cette fois, avec de l'albumine radiomarquée pour laquelle il n'existe pas de mécanisme de transport actif.

Hypothèse 3.2 : Sachant que la surexpression prolongée d'ApoD dans le cerveau mène au développement d'une stéatose hépatique et musculaire. Ces deux tissus devraient être ciblés par l'ApoD qui atteint la circulation périphérique.

Hypothèse 3.3 : L'ApoD est en mesure de traverser l'une ou plusieurs des barrières du SNC par transcytose à travers les cellules endothéliales.

Hypothèse 3.4 : Si un mécanisme de transcytose de l'ApoD à travers les cellules endothéliales existe, la BSG est fort probablement impliquée. La présence d'un autre agoniste de la BSG devrait donc faire compétition à l'ApoD et confirmer que la BSG est le récepteur permettant l'internalisation et la transcytose de l'ApoD dans ces cellules.

Hypothèse 3.5 : La présence de la BSG, le récepteur de l'ApoD, dans les organes périphériques devrait avoir un impacte sur l'efficacité d'accumulation de l'ApoD dans ces structures. Ainsi, on s'attend à ce que l'expression protéique de la BSG soit positivement et fortement corrélée avec le taux d'accumulation de l'ApoD dans ces organes.

CHAPITRE II

DES HAUT NIVEAUX PROTÉIQUES D'APOD DANS LE DÉPÔT ADIPEUX
DU LIGAMENT ROND EST ASSOCIÉ AVEC UN MEILLEUR PROFIL
MÉTABOLIQUE CHEZ LES FEMMES SÉVÈREMENT OBÈSES

HIGH APOD PROTEIN LEVEL IN THE ROUND LIGAMENT FAT DEPOT OF
SEVERELY OBESE WOMEN IS ASSOCIATED WITH AN IMPROVED
METABOLIC PROFILE

Frédéric Desmarais, Karl-F. Bergeron, Michel Lacaille, Isabelle Lemieux, Jean Bergeron, Simon Biron, Éric Rassart, Denis R. Joannisse, Pascale Mauriège and Catherine Mounier

Endocrine. 2018 February 1, 61(2):248-257

2.1 Avant-Propos

La réalisation de ce chapitre a été effectuée dans le but de déterminer si l'ApoD est associée au maintien ou à la détérioration de la santé métabolique chez l'humain. Bien entendu, le concept de santé métabolique est complexe et repose sur l'interaction de plusieurs organes et tissus. Plus particulièrement, cette portion de notre étude reposait sur les effets potentiels d'une haute expression (ARNm) ou accumulation (protéine) d'ApoD dans les tissus adipeux. Peu d'études se sont intéressées au rôle de l'ApoD dans les tissus adipeux. L'augmentation de l'expression de l'ApoD suivant la différenciation des préadipocytes en adipocytes matures (Hummasti et al., 2004) suggère toutefois que l'ApoD possède des fonctions importantes dans l'homéostasie du tissu adipeux. La présence accrue d'ApoD dans les adipocytes est d'autant plus intéressante puisque l'ARA induit l'incorporation des transporteurs de glucose GLUT1 et GLUT4 dans la membrane plasmique des adipocytes. Cet effet est d'ailleurs dépendant de PPAR γ (Nugent et al., 2001). Il est donc possible que l'ApoD joue un rôle de gestion de l'ARA dans les tissus adipeux où elle servirait de transporteur de ligands pour PPAR γ . Si c'était le cas, on s'attendrait donc à ce que l'expression adipeuse de l'ApoD soit positivement corrélée à la sensibilité au glucose des tissus adipeux. Il est également possible que l'ApoD régule l'inflammation dans les tissus adipeux. Considérant les nombreux effets anti-inflammatoire et antioxydant de l'ApoD (Rassart et al., 2020), sa présence dans les tissus adipeux a également le potentiel de limiter l'inflammation métabolique et donc d'indirectement améliorer la sensibilité à l'insuline. Il est intéressant de souligner qu'avant la présente étude, les seules données humaines liant l'ApoD à l'obésité avaient été recueillies par l'étude de Do Carmo *et al.* 2009. Cette étude démontrait que les niveaux plasmatiques d'ApoD diminuaient chez

la mère au cours de la grossesse. Cette diminution était exacerbée chez les femmes ayant un gain de poids gestationnel supérieur à 18 kg (Do Carmo, Forest, et al., 2009).

Nous avons donc choisi d'évaluer si l'ApoD dans les tissus adipeux est effectivement associée au contrôle de la glycémie, à l'inflammation et à la sensibilité à l'insuline chez l'humain. Pour ce faire, nous avons eu recours à une collaboration avec le laboratoire de la Dr. Pascale Mauriège de l'université Laval afin de recueillir des échantillons de tissus adipeux et de sang ainsi que les mesures anthropométriques de 44 femmes sévèrement obèses. Cette cohorte avait la particularité de contenir à la fois des patients en condition dysmétabolique, mais également en condition non dysmétabolique. L'étude de l'association de l'ApoD avec les marqueurs de santé métabolique chez ces femmes servait donc également à déterminer si l'ApoD était un biomarqueur prédictif d'une « résistance » au développement des comorbidités de l'obésité. Aussi, comme chaque tissu adipeux possède ses propriétés distinctes, cette étude a été effectuée sur trois tissus adipeux distincts, soit le tissu adipeux omental (OM), mésentérique (ME) et le tissu adipeux du ligament rond (*round ligament*, RL). Le RL est un tissu adipeux qui se développe entre les lobes du foie chez les individus sévèrement obèses et est associé à un meilleur profil métabolique et inflammatoire comparativement aux autres tissus adipeux intraabdominaux (Mauriège et al., 2016).

Cette étude nous a permis de démontrer que le niveau d'expression protéique de l'ApoD est positivement corrélé avec l'index de sensibilité à l'insuline (QUICKI) dans tous les tissus adipeux. Aussi, les femmes ayant une haute expression protéique d'ApoD dans leur RL ont également tendance à avoir des taux circulants plus faibles de PAI-1 et de TNF- α . Un des résultats les plus intéressants de cette étude était que les niveaux d'accumulation protéiques d'ApoD dans les tissus adipeux variaient considérablement à travers les tissus d'une même patiente et de patient à patient. Aussi, la plupart des corrélations n'avaient un poids statistiquement significatif qu'avec les

niveaux protéiques d'ApoD et non avec l'ARNm. Par conséquent, l'accumulation d'ApoD exogène est probablement plus importante aux phénomènes observés que l'ApoD produite localement. Il est donc fort possible que ces deux sources d'ApoD aient différentes fonctions dans les tissus adipeux.

2.2 Résumé

L'Apolipoprotéine D (ApoD) est une lipocaline participant au transport des lipides. Elle a la capacité de pouvoir lier une grande variété de ligands dont l'acide arachidonique avec qui elle interagit avec la plus forte affinité. Il est donc considéré que l'ApoD possède de multiples fonctions. Nous avons étudié le rôle potentiel de l'ApoD dans la sensibilité à l'insuline, l'inflammation et la formation de caillots sanguins (thrombose), liée au métabolisme lipidique, chez les femmes sévèrement obèses. Nous avons mesuré l'expression de l'ApoD dans trois tissus adipeux chez une cohorte de 44 femmes sévèrement obèses qui incluait des patientes dysmétaboliques et non dysmétaboliques. Les caractéristiques physiques et métaboliques ont également été mesurées à partir des mesures anthropomorphiques et d'échantillons sanguins. L'ApoD a été quantifiée au niveau de l'ARNm ainsi qu'au niveau protéique dans des échantillons provenant de trois tissus adipeux (Adipose tissue, AT) intra-abdominaux : omental (OM), mésentérique (ME) et ligament rond (round ligament, RL). Les niveaux protéiques d'ApoD étaient très variables entre les AT d'un même individu. Une haute expression protéique d'ApoD était liée à des niveaux plus faibles d'insuline dans le plasma (-40%, $p = 0.015$), une plus faible résistance à l'insuline (-47%, $p = 0.022$) et une meilleure sensibilité à l'insuline (+10%, $p = 0.008$). Les niveaux circulants des facteurs pro-inflammatoires PAI-1 (-39%, $p = 0.001$), and TNF- α (-19%, $p = 0.030$) étaient également inversement corrélés au niveau d'ApoD protéique dans le RL AT. La variabilité des niveaux d'expression de l'ApoD était compatible avec la variabilité de l'efficacité d'accumulation et/ou des fonctions métaboliques en lien avec la localisation anatomique des dépôts adipeux. La plupart des corrélations statistiquement significatives étaient liées au niveau protéique d'ApoD et non aux niveaux d'ARNm. Cela coïncide à la dynamique attendue d'une protéine circulante s'accumulant dans des tissus cibles. Dans l'ensemble, toutes les corrélations associaient un haut niveau d'ApoD à un meilleur profil métabolique chez les femmes sévèrement obèses.

Mots clefs: Apolipoprotéine D, Obésité, Ligament rond, Insuline, Plasminogen activator inhibitor-1, Tumor necrosis factor- α

2.3 Abstract

Apolipoprotein D (ApoD) is a lipocalin participating in lipid transport. It binds to a variety of ligands, with a higher affinity for arachidonic acid, and is thought to have a diverse array of functions. We investigated a potential role for ApoD in insulin sensitivity, inflammation, and thrombosis—processes related to lipid metabolism—in severely obese women. We measured ApoD expression in a cohort of 44 severely obese women including dysmetabolic and non dysmetabolic patients. Physical and metabolic characteristics of these women were determined from anthropometric measurements and blood samples. ApoD was quantified at the mRNA and protein levels in samples from three intra-abdominal adipose tissues (AT): omental, mesenteric (ME) and round ligament (RL). ApoD protein levels were highly variable between AT of the same individual. High ApoD protein levels, particularly in the RL depot, were linked to lower plasma insulin levels (−40%, $p = 0.015$) and insulin resistance (−47%, $p = 0.022$), and increased insulin sensitivity (+10%, $p = 0.008$). Lower circulating pro-inflammatory PAI-1 (−39%, $p = 0.001$), and TNF- α (−19%, $p = 0.030$) levels were also correlated to high ApoD protein in the RL AT. ApoD variability between AT was consistent with different accumulation efficiencies and/or metabolic functions according to the anatomic location of fat depots. Most statistically significant correlations implicated ApoD protein levels, in agreement with protein accumulation in target tissues. These correlations associated higher ApoD levels in fat depots with improved metabolic health in severely obese women.

Keywords: Apolipoprotein D, Obesity, Round ligament, Insulin, Plasminogen activator inhibitor-1, Tumor necrosis factor- α

2.4 Introduction

Obesity, defined as an excessive accumulation of body fat, is a condition steadily increasing in prevalence in developed and developing countries. There are now approximately 2.1 billion people that are overweight or obese worldwide (K. B. Smith & Smith, 2016). In western countries, a common clinical definition of obesity is a body mass index (BMI) above 30 kg/m². Obesity is further separated in three classes: class I with a BMI ≥ 30.0 kg/m², class II with a BMI ≥ 35.0 kg/m² and class III with a BMI ≥ 40.0 kg/m² (Jensen et al., 2014). The global obesity crisis is of importance as obesity is a major risk factor for health complications including cardiovascular disease, metabolic syndrome, type 2 diabetes, and chronic inflammation (Jensen et al., 2014). Inflammation has been found to be both a consequence of and a contributing factor to fat accumulation (Agrawal et al., 2016; Hotamisligil, 2017). The expansion of adipose tissues (ATs) results in their invasion by polarized M1 macrophages, which secrete pro-inflammatory cytokines such as interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) (Lumeng, Bodzin, & Saltiel, 2007). Adipocytes also contribute to IL-6 secretion (Harkins et al., 2004). Fat accumulation and proinflammatory cytokine secretion increase together during the development of obesity, resulting in particularly high plasma cytokine levels in class III obese individuals (Mauriege et al., 2015). Chronic inflammation, in turn, impairs insulin signaling, and sensitivity (Agrawal et al., 2016; Hotamisligil, 2017) and promotes AT expansion (Handoko, Yang, Strutt, Khalil, & Killinger, 2000). However, some obese individuals maintain almost normal

insulinemia and insulin sensitivity. These patients—often referred to as non-dysmetabolic—tend to show lower levels of circulating cytokines compared to their dysmetabolic counterparts (Mauriege et al., 2015). While AT expansion is strongly correlated with an aggravation of the metabolic profile, some fat depots are less deleterious than others (Berg & Scherer, 2005). Some AT, like the brown fat, are even considered beneficial (Ouellet et al., 2012). The presence of round ligament (RL) fat in obese individuals has been considered relatively protective as it produces less pro-inflammatory factors than mesenteric (ME) and omental (OM) fat depots (Mauriege et al., 2016). Apolipoproteins are a class of proteins that bind and transport lipids through the circulatory and lymphatic systems. ApoD is a glycosylated 19-to-32 kDa protein member of the lipocalin superfamily that possesses a pocket able to bind to a large array of small hydrophobic ligands. Among these ligands are arachidonic acid (ARA), bilirubin, and a large number of steroids (Rassart et al., 2000). While ApoD is mostly expressed in the nervous system, reproductive glands, adrenal glands, kidney, lung, spleen, pancreas, and placenta (Rassart et al., 2000), it is also expressed in AT (Rassart et al., 2000; J. Zhang et al., 2007). Most of the research on ApoD has focused on its neuroprotective and anti-inflammatory functions in neurodegenerative diseases (Desai et al., 2005; Kalman et al., 2000; Ana Navarro, del Valle, Astudillo, González del Rey, & Tolivia, 2003; Rickhag et al., 2008; Terrisse et al., 1998; E. A. Thomas et al., 2003; E. A. Thomas et al., 2001; E. A. Thomas & Sutcliffe, 2002). However, considering its high-plasma level (about 12 mg/100 mL) (Camato et al., 1989), ApoD is expected to play some functions related to lipid metabolism outside of the nervous system. In fact, there is a direct link between ApoD deficiency and insulin resistance (IR) in mice. ApoD knockout mice show higher plasma insulin and triacylglycerol (TAG) levels, and lower epididymal lipoprotein lipase (LPL) levels (Jimenez-Palomares et al., 2011), while transient hepatic ApoD overexpression increases serum LPL activity and reduces circulating TAG (Perdomo et al., 2010). Moreover, long-term neuronal overexpression of ApoD induces non-inflammatory hepatic steatosis and IR in 1-year-old transgenic

mice (Do Carmo, Fournier, et al., 2009; Labrie et al., 2015). Links between ApoD and insulin signaling/lipid metabolism can also be found in humans: a significant association exists between ApoD polymorphism and diabetes, obesity as well as hyperinsulinemia (Baker et al., 1994; Vijayaraghavan, Hitman, & Kopelman, 1994). ApoD adrenal gland expression is strongly downregulated in Cushing syndrome due to macronodular adrenal hyperplasia (Bourdeau et al., 2004). To date there have been no reports of humans with a complete deficiency in plasma ApoD. In light of these facts, we postulated that ApoD plays a role in AT metabolism and control of inflammation. As such, we searched for a potential link between the metabolic profile of severely obese individuals and ApoD expression in different intra-abdominal fat depots obtained during bariatric surgery.

2.5 Materials and methods

2.5.1 Patient selection

This study included 44 Caucasian premenopausal severely obese women with a mean BMI of 53.6 kg/m², who were candidates for biliopancreatic diversion with duodenal switch surgery at the Quebec Heart and Lung University Institute Hospital (Marceau et al., 1998). Subjects with hepatotoxic medication, history of hepatitis, prior weight-loss surgery, smoking and/or consuming more than 100 g of alcohol per week were excluded. Thirteen women were diabetic according to the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus WHO guidelines. Although diabetic subjects were treated pharmacologically for their condition, none were treated with glitazones. The appropriate ethics committee approved the experimental design (Laval University Ethics Committee approval CERUL # 2004-108), and all participants provided their written informed consent.

2.5.2 Anthropometric measurements and blood sampling

Patients were weighed in a light gown on an electronic Toledo scale adapted for body weight greater than 136 kg, and BMI was calculated as the ratio of weight (kg) to height squared (m^2). Body fat distribution was assessed using waist circumference measured in a standard position at the widest circumference of the umbilical level. Blood sampling was performed in the morning after an overnight fast (12 h minimum). Plasma cholesterol, HDL-cholesterol, low density lipoprotein-cholesterol, TAG, and fasting glucose concentrations were evaluated by routine methods in the clinical laboratories of the Heart and Lung University Institute Hospital in Quebec City. Plasma insulin concentrations were determined with a high-sensitivity ELISA (Millipore, EZHI-14K). IR based on the “Homeostasis Model Assessment” (HOMA) index was evaluated according to the following equation: $\text{insulin } (\mu\text{UI/mL}) \times \text{glucose (mmol/L)}/22.5$ (Matthews et al., 1985), whereas the “Quantitative Insulin Check Index” (QUICKI), which reflects insulin sensitivity was calculated as follows: $1/\log [(\text{fasting insulin}) (\mu\text{UI/mL}) \times (\text{fasting glucose}) (\text{mg/dL})]$ (Katz et al., 2000). Plasma TNF- α and IL-6 concentrations were measured with a high sensitivity ELISA (R&D Systems, DTA00C, and D6050). The run-to-run coefficients of variation were less than 10% for IL-6 and TNF- α (Caspar-Bauguil et al., 2012). Finally, another blood sample was collected in plastic tubes containing trisodium citrate anticoagulant with great care in order to minimize platelet activation. Plasma plasminogen activator inhibitor-1 (PAI1) antigen levels were measured with the Asserachrom PAI1 ELISA kit (DiagnosticaStago, 00949US), and both intra and inter-assay coefficients of variation were <5% (Bouchard et al., 2010)

2.5.3 Adipose tissue removal

AT samples were recovered during gastric bypass surgery following an overnight fast (at least 12 h). General anesthesia was induced by a short-acting barbiturate and

maintained by fentanyl and a mixture of oxygen and nitrous oxide. Patients did not receive drugs acting on the autonomic nervous system or modifying catecholamine levels (Caspar-Bauguil et al., 2012). All fat depots under consideration are drained by the portal vein or its collaterals, and classified as intraabdominal (Netter, 1989), and more particularly as intraperitoneal fat (Fried & Ross, 2004). After surgical excision, AT samples of approximately 200 mg were obtained from the OM and ME depots (M. J. Lee, Wu, & Fried, 2013; Tchernof & Despres, 2013), as well as from the RL fat surrounding the liver. From these samples, 100 mg were used for quantification of the ApoD mRNA levels in AT.

2.5.4 Immunoblotting

To prepare total protein extracts, 100 mg of AT samples were homogenized in lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 250 mM sucrose, 1% v/v Triton X-10, 100 mM NaF, 10 mM Na-pyrophosphate, 1 mM EDTA, 1 M DTT, 1 mM Na-vanadate, 1 mM PMSF). Samples were centrifuged at $23,000 \times g$ for 20 min at 4°C and the lipid layer and cell debris were discarded. Total protein concentration was measured using the Bradford Assay (Sigma Aldrich) (M. M. Bradford, 1976). For each sample, 10 µg total proteins were loaded and separated on a 10% SDS-polyacrylamide gel. The proteins were then transferred to PVDF membranes, blocked with 10% w/v skim milk (powder) in Tris-buffered saline (pH 7.4) supplemented with 0.1% v/v Tween and incubated with anti-human-ApoD mouse monoclonal antibody (clone 2B9; 1:1000) (Do Carmo, Forest, et al., 2009). The primary antibody was then detected using anti mouse IgG conjugated to horseradish peroxidase (Cell Signaling, 7076 S; 1:1000) and visualized by chemiluminescence (Chemiluminescent HRP Substrate; Millipore). Amido Black staining was used as loading control (Aldridge, Podrebarac, Greenough, & Weiler,

2008). Bands were quantified by densitometry using the Gel Analyzer function of Image J software.

2.5.5 Statistical analyses

Raw values for all measurements are included as supplementary material (Table S1). For cohort division according to ApoD protein levels, the median value was used as the cutoff point between low and high groups for each fat depot. For cohort division according to BMI, one group included values between 40 and 49.9 kg/m², and the other group included values of 50 kg/m², and above. Results are presented as mean ± standard deviation (SD) in tables and as mean ± standard error of the mean (SEM) in figures. Associations between variables of interest were quantified by linear regression analysis using Pearson's product moment correlation coefficients. Statistical significance was considered reached if $p < 0.05$.

2.6 Results

ApoD expression levels correlate with improved metabolic markers in severely obese women. Physical and metabolic characteristics of 44 severely obese women (classes II and III) were determined from body measurements and blood samples (Table 2.1). Although the “classical” dysmetabolic profile associated with obesity (i.e., hyperlipidemia and hyperglycemia) was observed, half of the women presented at least some metabolically healthy values such as high HDL-cholesterol, low circulating TAG and/or low insulin levels (Carpene et al., 2016). Samples from OM, ME, and RL AT were collected from these women during intraabdominal surgery (Mauriege et al., 2016) and the levels of ApoD mRNA and protein expression were measured. Mean ApoD protein levels were similar in all AT sampled (Fig. 2.1a). However, we observed notable regional variations in ApoD expression levels within the same individual.

ApoD levels in any one AT did not correlate with ApoD levels in other fat depots (Fig. 2.1b). Because different AT are thought to have various effects on metabolism (Berg & Scherer, 2005; Ouellet et al., 2012), we examined potential associations between ApoD levels and the various biomarkers that were evaluated in these women. ApoD mRNA and protein levels correlated significantly with several biomarkers (Table 2.2). More correlations were observed with ApoD protein levels than with mRNA levels, probably because ApoD is a circulating protein that can accumulate in target tissues (Rassart et al., 2000). Interestingly, the QUICKI insulin sensitivity index was positively associated with ApoD protein levels in all fat depots examined. In the ME fat, ApoD mRNA levels correlated negatively with circulating IL-6 while ApoD protein levels correlated negatively with circulating proinflammatory TNF- α . In the RL AT, ApoD protein levels were negatively associated with patient age and circulating prothrombotic PAI-1. Although not statistically significant, there was a trend towards a negative association between ApoD protein and fasting insulin levels in the RL fat depot. Altogether, these observations suggest a possible beneficial role for ApoD insulin signaling and inflammation. ApoD protein levels in the round ligament fat are associated with improved insulin sensitivity and inflammation. We further explored the potential link between ApoD protein level assessed at the AT level and metabolic health by dividing the samples from severely obese women in two subgroups based on the ApoD protein level for each fat depot (around the median value; Supplementary Fig. S1). Since ApoD protein levels vary considerably between AT of the same individual, this division process resulted in different women being (sub)grouped together when different AT are considered. In the RL AT, higher levels of ApoD protein were associated with lower BMI and waist circumference (Fig. 2.2a) as well as improved insulin metabolism: lower fasting insulin levels and HOMA-IR index, and higher QUICKI (Fig. 2.2b). Interestingly, the QUICKI index was positively associated with ApoD levels in the OM fat and, while not statistically significant, an analogous trend was observed in the ME depot ($p = 0.0591$). Circulating PAI-1 and TNF- α were

negatively associated with ApoD protein levels in the RL AT (Fig. 2.2c). A trend toward low TNF- α was also associated with high ApoD levels in the ME fat ($p=0.0605$). Plasma IL-6 levels were not linked to ApoD protein levels, irrespective of the AT examined. In an effort to test the specificity and robustness of the links we uncovered between AT ApoD protein levels and metabolic markers, the samples from severely obese women were differently divided, this time according to BMI ($BMI \geq 50$ kg/m² and $50 > BMI \geq 40$ kg/m²; Fig. 3). As expected, this procedure resulted in two groups showing a significant difference in BMI and waist circumference (Fig. 2.3a). No differences in ApoD protein levels were found between these groups, irrespective of the AT considered. Division of the cohort according to BMI showed better insulin metabolism in less obese women: lower fasting insulin levels and HOMA-IR index, and higher QUICKI (Fig. 2.3b). While it was not associated with circulating PAI-1 or TNF- α levels, lower BMI was also linked to decreased IL-6 levels (Fig. 2.3c). Similar results were obtained with a cohort division based on waist circumference (data not shown). Taken together, our observations suggest that the link between high ApoD levels and lower inflammatory markers (PAI-1 and TNF- α circulating levels) in severely obese women is specific to the accumulation of ApoD protein in particular AT depots such as the RL fat, and not merely a consequence of lower BMI.

2.7 Conclusion

In this study, we demonstrated that the ApoD level in specific fat depots is associated with several metabolic factors. As ApoD is a circulating protein that can accumulate in specific tissues including liver and AT (Rassart et al., 2000), correlations with ApoD protein levels are probably more relevant to the patient's metabolic profile than ApoD mRNA levels. The source of human tissue (gastric bypass surgery patients) limited our study to mesenteric, omental and round ligament fat depots from severely obese women. AT samples collected for this study were heterogeneous, containing adipocytes but also

stromal cells, including pre-adipocytes, macrophages, and lymphocytes. This heterogeneity may influence gene expression and protein level measurement (including ApoD and other relevant markers), depending on the proportion of each cell type, and should be kept in mind during interpretation of our results. Despite this caveat, interesting relationships were found in our analyses associating higher ApoD levels with improved metabolic health as inferred from lower levels of harmful biomarkers. Insulin sensitivity (as measured by QUICKI) was particularly correlated with ApoD protein levels in all fat depots examined. While thrombosis and inflammation markers correlated for the most part with ApoD protein levels in the RL fat. ApoD protein levels were highly variable between AT of the same individual, suggesting different accumulation efficiencies and/or metabolic functions according to the anatomic location of fat depots. The mechanism of ApoD protein internalization by adipocytes could be critical in understanding this variability. The intriguing link we uncovered between ApoD protein level and age, suggesting that younger severely obese women may have more ApoD in their RL fat, could be explained by differences in ApoD internalization. The ApoD receptor Basigin (CD147) was recently identified in neurons (Najyb et al., 2015). This receptor is expressed in most if not all tissues, including AT (Scherer, Bickel, Kotler, & Lodish, 1998), and may, therefore, play a major role in ApoD internalization by fat. As such, the variability of ApoD accumulation in one AT compared to another might be due to its own Basigin levels. This, however, remains to be validated. On the other hand, the single correlation observed between ApoD mRNA level and IL-6 in the ME fat deposit (Table 2.2) is indicative of a regulation mechanism at the transcriptional level. In fact, IL-6 has been shown to reduce the expression of ApoD in 293T cells (Blais et al., 1995). However, it is not clear why evidence of this potential transcriptional regulation was only found in ME fat. This might constitute further evidence of functional differences between AT (Björntorp, 2000; Bonora, 2000; Wajchenberg, 2000). A better resolution of ApoD's link with key metabolic health factors was observed after we divided the cohort into high vs. low ApoD protein levels.

This division revealed that higher levels of protein ApoD in the RL fat were linked to lower BMI and waist circumference, to improved insulin metabolism (as measured by three criteria: fasting insulin, HOMA-IR, and QUICKI) and to reduced systemic inflammation. Since a reduction of adiposity and abdominal fat accumulation (i.e., reduced BMI) has an impact on insulin sensitivity and chronic inflammation (Jensen et al., 2014), we examined the impact of BMI and waist circumference on those metabolic parameters in our cohort. Interestingly, when the cohort was divided according to BMI, the association with inflammation markers PAI-1 and TNF- α was lost. This argues for a critical link between ApoD protein levels and inflammation profile, specifically in the RL fat. Of note, IL-6 secretion was significantly different between BMI subgroups, a biomarker that was not linked to ApoD levels in our previous division. This would suggest that the links we observe between ApoD protein and inflammation are independent of BMI in severely obese women. Pioneering work on the physiological role of the RL AT has shown that it possesses distinct metabolic properties (Marette et al., 1997; Mauriege et al., 1995). Our analysis suggests a specific role for ApoD in the RL fat that appears different than for the other AT examined. In agreement, previous studies have shown different physiological roles for different AT depots (Björntorp, 2000; Bonora, 2000; Wajchenberg, 2000). However, it is unlikely that the RL AT on its own can significantly impact whole-body state/function given its surmised small size. Its mass has never been clearly determined in either normal or obese individuals but, because of its anatomical location between the falciform and the round ligaments, its size is assumed to be restricted. Nonetheless, the RL AT could serve as an indicator that similar changes are occurring to other adipose depots or other tissue types throughout the body, and together they could have a significant physiological impact. One possible mechanism of action for ApoD in fat depots is through its well-known role in the modulation of inflammation. Indeed, ApoD possesses inflammation repression functions (Do Carmo, Jacomy, Talbot, & Rassart, 2008; Ganfornina et al., 2008); it is, therefore, possible that ApoD can contribute to the reduction of TNF- α

secretion observed in the high RL AT ApoD group. One mechanism for this ApoD property could be through ARA transport. ARA is the source of all eicosanoid production and an

increase in the ARA supplied to AT's leukocytes is likely to increase eicosanoid production, of which prostaglandin E2 (PGE2) is a prime example. While low doses of PGE2 have a pro-inflammatory effect on leukocytes, higher doses of PGE2 actually inhibits leukocyte TNF- α secretion by increasing intracellular cAMP levels (J. Moore, Cook, Morris, Halushka, & Wise, 1990; S. Watanabe, Kobayashi, & Okuyama, 1994). This hypothesis has strong implications for insulin sensitivity, as TNF- α has been shown to inhibit insulin signaling and expression through c-Jun N-terminal kinase activation, which results in inhibition of insulin receptor substrate-1, Akt/protein kinase B, and insulin gene transcription (Agrawal et al., 2016). Therefore, ApoD may indirectly promote insulin sensitivity through a reduction of TNF- α secretion. Also, the correlation we observed between ApoD in the RL fat and PAI-1 might be an indirect consequence of ApoD's effect on TNF α and insulin levels, as they in turn modulate PAI-1 (Cesari, Pahor, & Incalzi, 2010). In conclusion, our study is the first to suggest a role for the ApoD protein in AT. ApoD accumulation in the three AT examined in our study correlated with improved systemic metabolic factors, including insulin sensitivity and inflammation. However, only accumulation to the RL fat depot was simultaneously correlated to all of these factors in severely obese women.

2.8 Acknowledgements

The Laval University Merck-Frosst/CIHR Research Chair in Obesity supported the severely obese cohort. Many thanks are also expressed to Drs V. Drapeau and F.

Therrien for their very helpful assistance in plasma and adipose tissue bank management. The cooperation of subjects who participated to this study was also greatly appreciated.

Funding For this specific study, P.M. received funding from the Quebec University Heart and Lung Institute (collaborators: D.R.J. and C.M.). Compliance with ethical standards

2.9 Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

Ethical approval The Laval University Ethics Committee approved the experimental design (CERUL # 2004-108). Informed consent All participants provided their written informed consent.

2.10 Figure legends

Figure 2.1. ApoD protein levels amongst adipose tissues of each individual. (A) ApoD protein expression was quantified by Western blot and normalized to Amido Black in each AT (n=8): omental (OM), mesenteric (ME) and round ligament (RL). Histograms show mean value \pm SEM. A Student's t test showed no statistically significant difference in ApoD protein levels between AT. An example of a typical Western blot comparing 4 different samples of each AT is provided. (B) The stacked histogram shows the relative the distribution of ApoD protein levels in the three AT of each patient (n=35).

Figure 2.2. Metabolic profiles associated with ApoD protein level. The cohort of severely obese women was divided into two groups, corresponding to high versus low ApoD protein levels, in each AT: omental (OM, n=46), mesenteric (ME, n=38) and round ligament (RL, n=45). We considered (A) general body characteristics: body mass index (BMI) and waist circumference (WC); (B) insulin-related factors: fasting insulin level, homeostasis model assessment-insulin resistance index (HOMA-IR) and quantitative insulin sensitivity check index (QUICKI); as well as (C) inflammatory and pro-thrombotic markers: tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6) and plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1). Histograms show mean value \pm SEM. A Student's t test was used to show statistically significant difference; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Figure 2.3. Metabolic profiles associated with body mass index. The cohort of severely obese women (n=48) was divided into two groups, corresponding to high versus low body mass index (BMI). We considered (A) general body characteristics: BMI and waist circumference (WC); (B) insulin-related factors: fasting insulin level, homeostasis model assessment-insulin resistance index (HOMA-IR) and quantitative insulin sensitivity check index (QUICKI); as well as (C) inflammatory and pro-thrombotic markers: tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6) and plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1). Histograms show mean value \pm SEM. A Student's t test was used to show statistically significant difference; **** $p < 0.0001$.

Supplementary Figure 2.1. Division of the cohort into high versus low ApoD protein expression in various fat depots. The cohort of severely obese women was divided into two groups, corresponding to high versus low ApoD protein levels, around the median value in each AT: omental (OM, n=46), mesenteric (ME, n=38) and round ligament (RL, n=45). Scatter plots show the distribution of relative ApoD protein levels in patient samples after division in each fat depot. A Mann-Whitney non-parametric test

was used to compare groups with unequal standard deviation and show statistically significant difference; **** $p < 0.0001$.

Table 2.1. Physical and metabolic characteristics of severely obese women. LDL low-density lipoprotein, HDL high-density lipoprotein, HOMA homeostasis model assessment, IR insulin resistance, QUICKI quantitative insulin sensitivity check index, PAI-1 plasminogen activator inhibitor-1, TNF- α tumor necrosis factor- α , SD standard deviation

Table 2.2. Correlation coefficients between ApoD levels (mRNA and protein) in various fat depots and patient metabolic characteristics. Values in bold are statistically significant ($p < 0.05$). LDL-C low-density lipoprotein-cholesterol; Insulin, fasting plasma insulin; QUICKI, quantitative insulin sensitivity check index; PAI-1, plasminogen activator inhibitor-1; TNF- α , tumor necrosis factor- α ; IL-6, Interleukin-6.

Figure 2.1

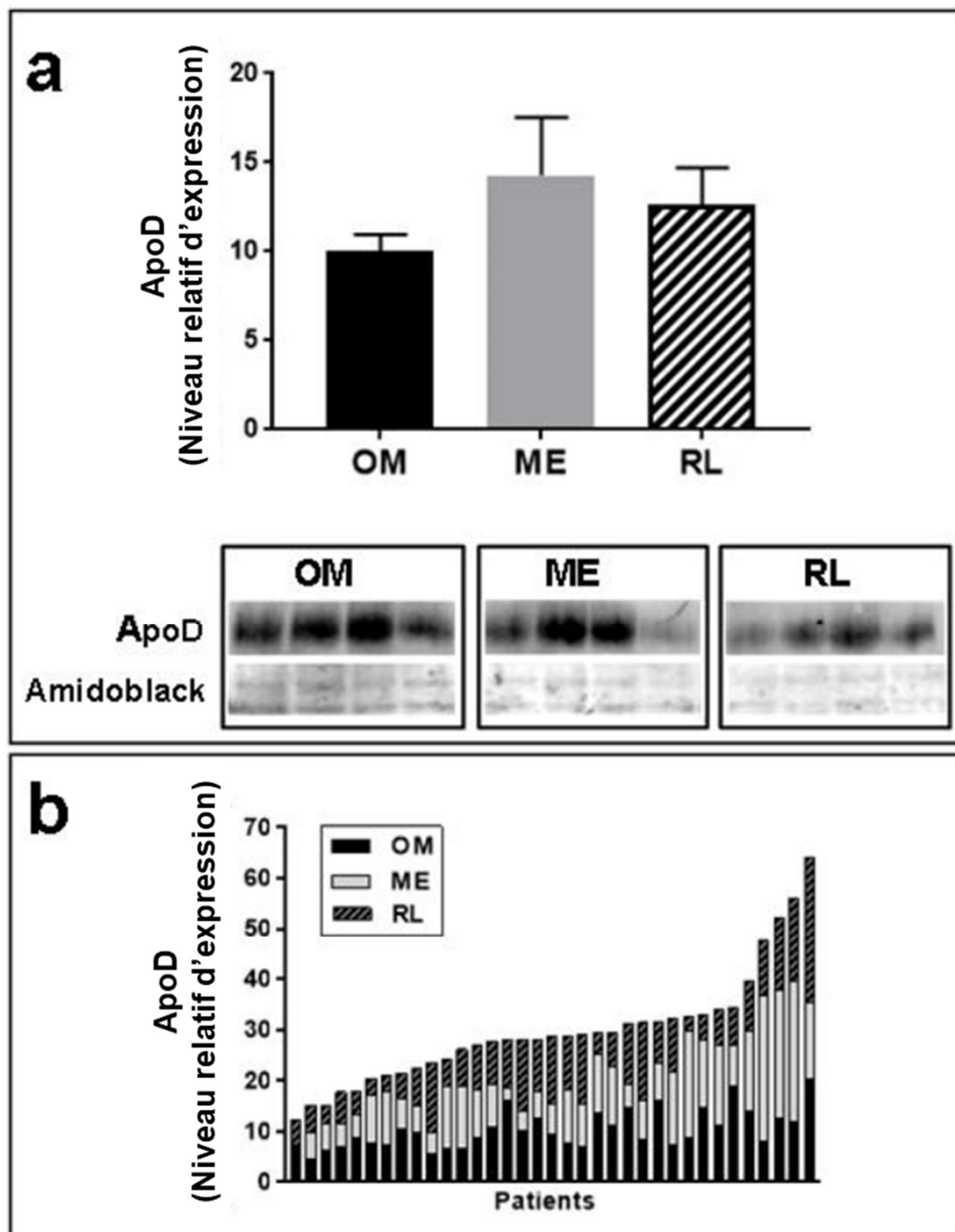


Figure 2.2

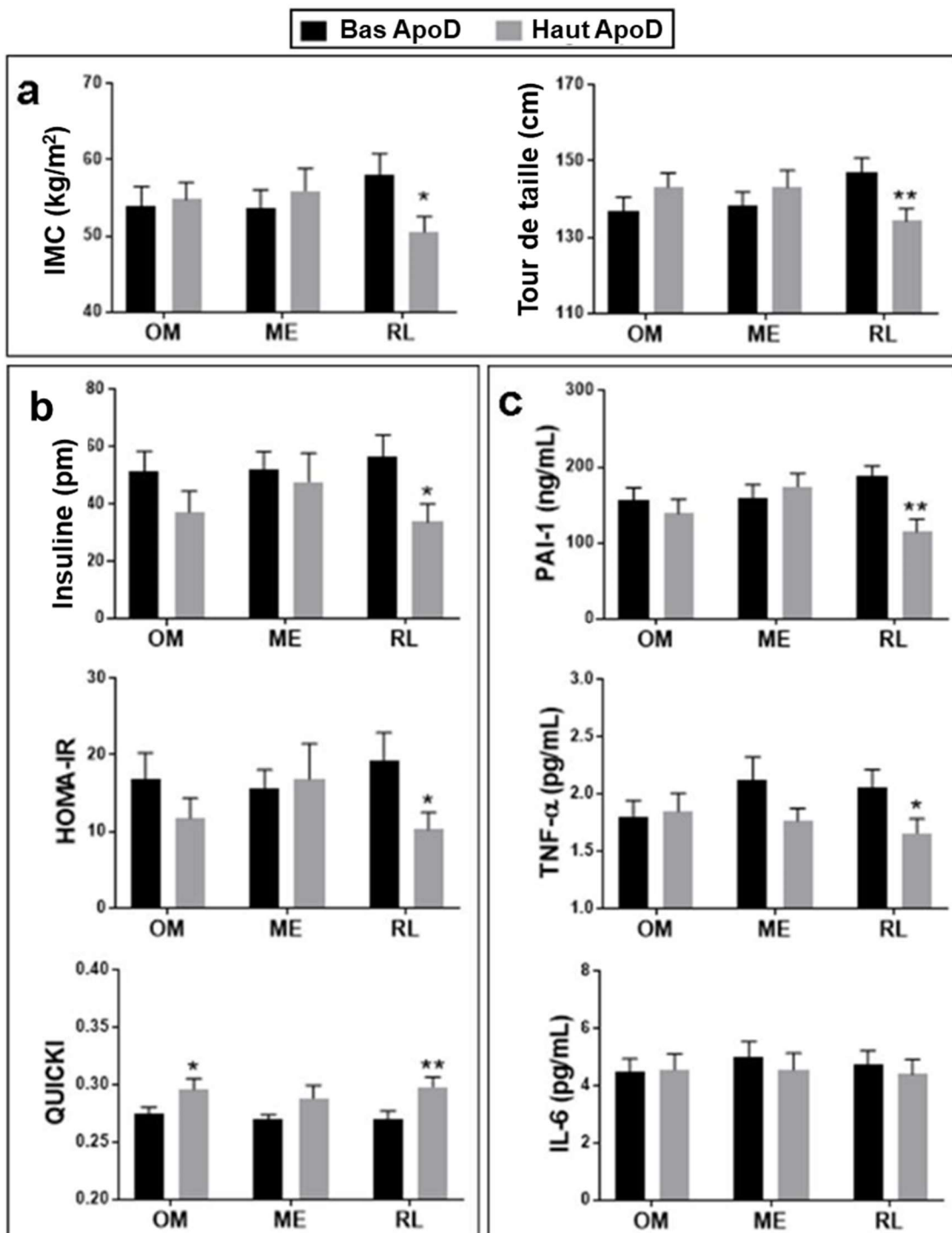
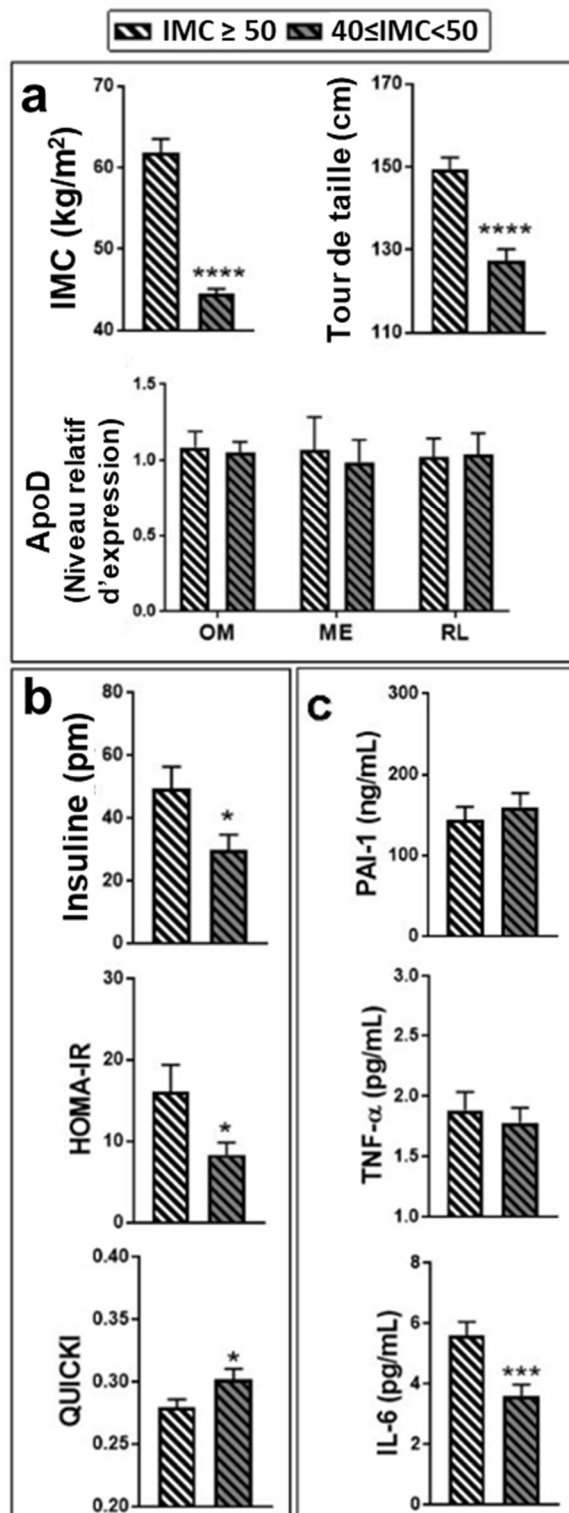


Figure 2.3



Supplementary figure 2.1

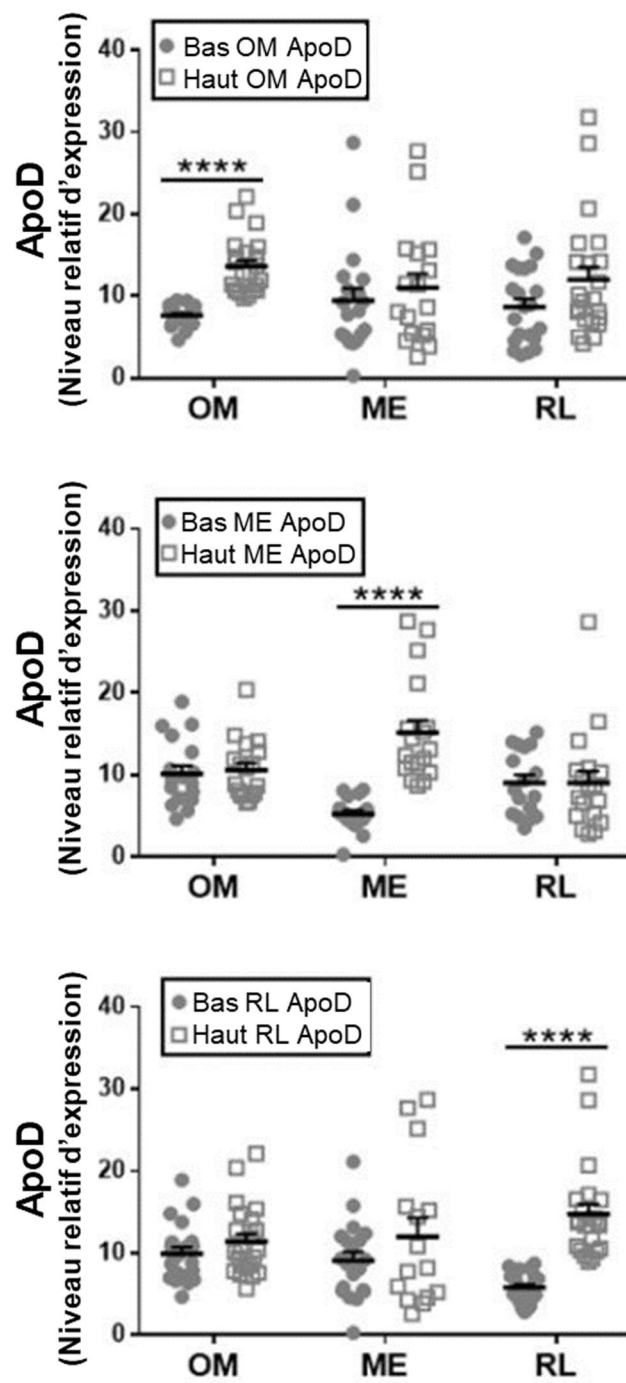


Table 2.1:

	Mean \pm SD	Range (min-max)
Âge (années)	38 \pm 9	21–54
Indice de masse corporelle (kg/m ²)	53.6 \pm 11	38–89
Tour de taille (cm)	139 \pm 18	110–180
Cholestérol (mmol/L)	4.8 \pm 1.0	2.3–7.7
LDL-Cholestérol (mmol/L)	2.8 \pm 0.9	0.8–5.4
HDL-Cholestérol (mmol/L)	1.3 \pm 0.4	0.7–2.5
Triacylglycérols (mmol/L)	1.6 \pm 0.8	0.3–4.2
Glucose à Jeun (mmol/L)	6.7 \pm 2.8	4.0–15.9
Insuline à Jeun (mmol/L)	42.4 \pm 32.8	4.0–128.8
Index HOMA-IR	13.5 \pm 13.9	1.2–69.5
Index QUICKI	0.29 \pm 0.04	0.22–0.37
PAI-1 (ng/mL)	153 \pm 77	10–262
TNF- α (pg/mL)	1.8 \pm 0.7	0.8–3.9
Interleukine-6 (pg/mL)	4.6 \pm 2.2	1.3–9.9

Table 2.2

Variables		Dépôt adipeux					
		OM (n=44)		ME (n=36)		RL (n=43)	
ApoD Source		Pearson's R	<i>p</i> -value	Pearson's R	<i>p</i> -value	Pearson's R	<i>p</i> -value
Âge	ARNm	-0.0353	0.8179	-0.0021	0.9901	-0.2416	0.1099
Cholestérol		0.1368	0.3703	0.2945	0.0727	0.1022	0.5042
LDL-Cholestérol		0.1462	0.3435	0.2873	0.0847	0.0780	0.6146
Insuline à Jeun		-0.1860	0.2267	0.0812	0.6327	-0.1653	0.2837
Index QUICKI		0.1833	0.2335	-0.0926	0.5858	0.1162	0.4527
PAI-1		-0.1524	0.3291	0.2961	0.0795	0.0493	0.7535
TNF- α		-0.2263	0.1396	0.0413	0.8081	0.0079	0.9596
IL-6		-0.0662	0.6731	-0.4658	0.0042	-0.0030	0.9846
Âge	Protéine	0.0530	0.7267	0.1313	0.4454	-0.3085	0.0392
Cholestérol		0.0292	0.8471	0.2427	0.1538	-0.0085	0.9558
LDL-Cholestérol		0.0337	0.8262	0.3237	0.0578	-0.0069	0.9646
Insuline à Jeun		-0.2184	0.1495	-0.2047	0.2381	-0.2785	0.0671
Index QUICKI		0.3358	0.0241	0.4527	0.0063	0.3089	0.0414
PAI-1		-0.1024	0.5081	0.0061	0.9726	-0.4868	0.0009
TNF- α		-0.0422	0.7833	-0.3689	0.0292	-0.2817	0.0639
IL-6		-0.0530	0.7325	-0.1134	0.5231	-0.0206	0.8956

1
2
3
4
5
6
7

8
9
10

11

12

13

14

15
16

17

CHAPITRE III

LA SUREXPRESSION DE L'APOLIPOPROTÉINE D ALTÈRE LES
MÉTABOLISMES HÉPATIQUES DES ACIDES GRAS OMÉGA ET DES
PROSTAGLANDINES LORS DU DÉVELOPPEMENT D'UNE STÉATOSE
HÉPATIQUE NON-INFLAMMATOIRE

APOLIPOPROTEIN D OVEREXPRESSION ALTERS HEPATIC
PROSTAGLANDIN AND OMEGA FATTY ACID METABOLISM DURING THE
DEVELOPMENT OF A NON-INFLAMMATORY HEPATIC STEATOSIS

Frederik Desmarais, Karl-F. Bergeron, Eric Rassart, Catherine Mounier

Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids (BBA-Lipids). 2019 January 7, 1864(4): 522-531

1 3.1 Avant-propos

2 Les résultats du chapitre II ont démontré qu'il existe effectivement une association
3 entre les niveaux protéiques de l'ApoD dans les tissus adipeux et la santé métabolique
4 et l'inflammation systémique. Or, la majeure partie de ces associations se trouvaient au
5 niveau de l'ApoD dans le RL, un dépôt adipeux se formant sur le ligament rond du foie.
6 Bien qu'il existe très peu d'étude sur le rôle de l'ApoD dans les tissus adipeux, quelques
7 études ont été menées sur les effets métaboliques de l'ApoD dans le foie. Deux études
8 portaient sur un phénomène intrigant, soit le développement d'une stéatose hépatique
9 non-inflammatoire chez les souris transgénique surexprimant l'ApoD dans leur cerveau.
10 La première étude, celle de Do Carmo *et al.* 2009 avait d'abord caractérisé ce
11 phénomène. À l'âge de douze mois, les souris transgéniques Tg(THY1-APOD1)¹Era
12 (en bref souris hApoD) présentaient une stéatose hépatique évidente caractérisée par
13 un contenu hépatique plus élevé en triglycérides. Toutefois, cette stéatose hépatique
14 n'était pas accompagnée par une élévation des taux circulants des enzymes hépatiques
15 AST et ALT, biomarqueurs du dommage hépatique. Aussi, les taux circulants de
16 plusieurs cytokines (IL-1 α , IL-6, et TNF- α) indiquaient une absence, voir même une
17 réduction, de l'inflammation systémique comparativement aux souris sauvages (*wild*
18 *type*, WT). Toutefois, les souris transgéniques présentaient une résistance à l'insuline
19 (Do Carmo, Fournier, et al., 2009). L'étude de Labrie *et al.* en 2015 sur ces mêmes
20 souris avait ensuite découvert que plusieurs protéines impliquées dans certaines voies
21 anaboliques et cataboliques étaient simultanément activées dans le foie des animaux
22 transgéniques. Notamment, la captation lipidique des hépatocytes des souris hApoD
23 était accrue et accompagnée par la surexpression du récepteur CD36 et du facteur de
24 transcription PPAR γ (Labrie et al., 2015). Enfin, les niveaux circulants d'ARA étaient
25 diminués en faveur d'une augmentation de leurs taux hépatiques. Tel que mentionné
26 précédemment, l'ARA est le ligand préférentiel de l'ApoD, ainsi que la base
27 moléculaire servant à la production des médiateurs lipidiques nommés eicosanoïdes. Il

1 avait donc été postulé que l'ApoD serait probablement directement responsable de
2 l'accumulation hépatique d'ARA. L'hypothèse subséquente était donc que cette
3 accumulation d'ARA se traduirait en une surproduction d'une ou plusieurs espèces de
4 médiateurs lipidiques. Une attention particulière avait été portée sur la famille des
5 prostaglandines et tout particulièrement sur la PGD₂ et la série J des prostaglandines
6 en raison de leur capacité à induire une robuste activation de PPAR γ dans les modèles
7 cellulaires (Bell-Parikh et al., 2003; Forman et al., 1995; Kliewer et al., 1997b).
8 L'absence, voir l'inhibition, de l'inflammation présente chez les souris hApoD malgré
9 la forte accumulation hépatique de lipides restait toutefois fort intrigante. D'autant plus
10 que l'ARA est fréquemment associé à l'inflammation puisqu'un grand nombre de ses
11 métabolites sont des inducteurs de l'inflammation (voir annexe A). Nous avons donc
12 entrepris de déterminer par quel moyen le statut non-inflammatoire était maintenu dans
13 le foie des souris hApoD malgré la progression de la stéatose hépatique en plus de
14 déterminer la séquence des évènements produisant cette même stéatose.

15 Pour ce faire, nous avons une fois de plus utilisé le modèle murin hApoD. Toutefois,
16 là où les études précédentes s'étaient contentées de caractériser le foie des souris au
17 moment où la stéatose était déjà bien établie, nous avons opté pour l'étudier à plusieurs
18 moments lors de son développement. Nous avons donc analysé des souris hApoD et
19 WT de 3, 6, 9 et 12 mois. Cette approche avait pour but de permettre l'observation de
20 la séquence chronologique des évènements menant à la stéatose. Elle permettait
21 également d'observer l'évolution de la polarisation inflammatoire au cours du
22 développement de la stéatose.

23 Cette étude a permis de déterminer que la déstabilisation des voies métaboliques
24 commence dès l'âge de six mois dans le foie des souris hApoD. À ce stade, la stéatose
25 n'est pas encore visible, mais la suractivation de PPAR γ et la surexpression de CD36
26 débute. Cette suractivation de PPAR γ coïncide avec une surproduction hépatique de

1 15d-PGJ₂ et une polarisation M1/M2 anti-inflammatoire. Une des particularités du foie
2 des souris âgées (12 mois) est une accumulation préférentielle de toutes les espèces
3 lipidiques d'acides gras oméga-3 et oméga-6 au détriment des acides gras saturés et
4 monoinsaturés. De plus, cette accumulation privilégie les oméga-3 et résulte en un
5 meilleur ratio oméga-3/oméga-6 chez les souris hApoD comparativement au contrôle
6 WT. De plus, une plus grande quantité de PGD₂, jugé anti-inflammatoire dans le
7 contexte hépatique, est produite à l'âge de 12 mois. Ce serait donc l'augmentation du
8 transport et/ou de l'accumulation d'acide gras oméga dans le foie à travers l'action de
9 l'ApoD qui créerait un effet en chaîne en modifiant le métabolisme des prostaglandines.
10 Cela engendrerait ultimement le développement d'une stéatose hépatique, mais
11 maintiendrait également une polarisation anti-inflammatoire M2 dans l'organe.
12 Toutefois, l'accumulation d'oméga-3 en plus des oméga-6 suggère que l'ApoD
13 pourrait lier et transporter au moins une espèce lipidique de la famille des oméga-3.

14 J'ai personnellement été impliqué dans toutes les étapes de ces travaux. De la
15 formulation des hypothèses de recherche, à l'élaboration des méthodes, à l'exécution
16 des expériences, puis à l'analyse des données et à l'écriture de l'article. Chacune de ces
17 étapes a été encadrée par ma directrice de recherche, Catherine Mounier, de mon
18 codirecteur Éric Rassart et de notre agent de recherche Karl-F Bergeron.

19

20

21

22

23

1 3.2 Résumé

2 L'Apolipoprotéine D (ApoD) est une lipocaline sécrétée associée avec la
3 neuroprotection et le métabolisme des lipides. La surexpression de l'ApoD dans les
4 tissus neuraux induit le développement d'une stéatose hépatique non-inflammatoire
5 chez les souris transgéniques âgées de douze mois. Des données précédemment
6 publiées indiquent que l'accumulation d'ARA, le ligand préférentiel de l'ApoD, et une
7 suractivation de PPAR γ sont probablement les éléments directeurs induisant cette
8 pathologie. Toutefois, l'absence d'inflammation dans ces conditions est surprenante.
9 Par conséquent, nous avons entrepris d'étudier les mécanismes de l'inflammation
10 durant le développement de la stéatose hépatique chez ces animaux transgéniques. La
11 modulation la plus précoce du métabolisme lipidique et de l'inflammation est survenue
12 à l'âge de 6 mois avec une surexpression transitoire de L-PGDS et la concomitante
13 surproduction du 15d-PGJ2, un puissant agoniste de PPAR γ . Une accumulation
14 lipidique hépatique fut ensuite détectable à l'âge de 9 mois. La polarisation
15 inflammatoire variait au long du développement, avec un profil anti-inflammatoire
16 robuste à 6 mois coïncidant avec la surproduction du 15d-PGJ2. Les acides gras oméga-
17 3 et oméga-6 étaient préférentiellement entreposés dans le foie des souris transgéniques
18 âgées de 12 mois et résultaient en un ratio oméga-3/oméga-6 plus élevé chez les
19 animaux transgéniques que chez les contrôles du même âge. Par conséquent,
20 l'inflammation semble contrôlée par plusieurs mécanismes dans le foie des souris
21 transgéniques : premièrement par une augmentation de la production de 15d-PGJ2 et
22 plus tard par un ratio oméga-3/oméga-6 bénéfique. PPAR γ semble jouer un rôle
23 important dans ces processus. L'accumulation de plusieurs espèces d'acides gras
24 oméga dans le foie des souris transgéniques suggère que l'ApoD est capable de lier un
25 plus grand nombre d'acides gras qu'il n'était initialement envisagé.

1 **Mots clefs** : Apolipoprotéine D, Stéatose hépatique, Prostaglandine 15d-PGJ2, Acide
2 gras oméga-6, acide gras oméga-3, *Peroxisome proliferator-activated receptor γ* .

3 3.3 Abstract

4 Apolipoprotein D (ApoD) is a secreted lipocalin associated with neuroprotection and
5 lipid metabolism. Overexpression of ApoD in mouse neural tissue induces the
6 development of a non-inflammatory hepatic steatosis in 12-month-old transgenic
7 animals. Previous data indicates that accumulation of arachidonic acid, ApoD's
8 preferential ligand, and overactivation of PPAR γ are likely the driving forces in the
9 development of the pathology. However, the lack of inflammation under those
10 conditions is surprising. Hence, we further investigated the apparent repression of
11 inflammation during hepatic steatosis development in aging transgenic animals. The
12 earliest modulation of lipid metabolism and inflammation occurred at 6 months with a
13 transient overexpression of L-PGDS and concomitant overproduction of 15d-PGJ2, a
14 PPAR γ agonist. Hepatic lipid accumulation was detectable as soon as 9 months.
15 Inflammatory polarization balance varied in time, with a robust anti-inflammatory
16 profile at 6 months coinciding with 15d-PGJ2 overproduction. Omega-3 and omega-6
17 fatty acids were preferentially stored in the liver of 12-month-old transgenic mice and
18 resulted in a higher omega-3/omega-6 ratio compared to wild type mice of the same
19 age. Thus, inflammation seems to be controlled by several mechanisms in the liver of
20 transgenic mice: first by an increase in 15d-PGJ2 production and later by a beneficial
21 omega-3/omega-6 ratio.

22 PPAR γ seems to play important roles in these processes. The accumulation of several
23 omega fatty acids species in the transgenic mouse liver suggests that ApoD might bind
24 to a broader range of fatty acids than previously thought.

1 Keywords: Apolipoprotein D, Hepatic steatosis, Prostaglandin 15d-PGJ2, Omega-6
2 fatty acid, Omega-3 fatty acid, Peroxisome proliferator-activated receptor γ

3

4 3.4 Introduction

5 Apolipoprotein D (ApoD) is a 25 to 30kDa glycosylated protein member of the
6 lipocalin superfamily (Balbín, Freije, Fueyo, Sánchez, & López-Otín, 1990; Kielkopf
7 et al., 2018; H. Li et al., 2016; Rassart et al., 2000). Its known biological functions are
8 associated to its capacity to bind several small hydrophobic molecules (Muffat &
9 Walker, 2010). In mice, ApoD expression is limited to the central nervous system
10 (CNS). In humans however, ApoD is expressed in the CNS, adrenal glands, kidneys,
11 pancreas, placenta, spleen, lungs, ovaries and testes (D. Drayna et al., 1986). Because
12 ApoD is massively overexpressed (up to 500-fold) during neurodegenerative stress
13 (Boyles, Notterpek, & Anderson, 1990; Boyles, Notterpek, Wardell, et al., 1990), it has
14 mainly been studied in a neural context. Some of ApoD's functions are mediated by its
15 capacity to bind arachidonic acid (ARA) (Elizabeth A. Thomas et al., 2003), a
16 polyunsaturated omega-6 fatty acid with the highest affinity among known ApoD
17 ligands (Morais Cabral et al., 1995). In re-cent years, roles for ApoD outside the CNS
18 have begun to emerge. Overexpression of human ApoD (hApoD) in transgenic mice
19 under the neuron specific THY1 promoter triggers a hepatic steatosis without hepatitis
20 at 12 months of age (Do Carmo, Fournier, et al., 2009). Transgenic hApoD mouse
21 livers are characterized by an overactivation of the peroxisome proliferator-activated
22 receptor gamma (PPAR γ) transcription factor, higher expression of the PPAR γ target
23 cluster of differentiation 36 (CD36) and higher fatty acid uptake. Lipogenesis, however,
24 is largely unaffected (Labrie et al., 2015). In general, hepatic lipid accumulation is
25 thought to lead to inflammation which, in turn, exacerbates lipid accumulation (two-

1 hit hypothesis) (Dowman, Tomlinson, & Newsome, 2010). This is not the case in the
2 livers of 12month-old hApoD animals (Do Carmo, Fournier, et al., 2009). No data has
3 yet been collected from younger hApoD mice. The absence of hepatic inflammation in
4 the transgenic mouse is particularly intriguing as hApoD livers are rich in ARA (Labrie
5 et al., 2015), a precursor for series 2 prostaglandins (PGE2, PGI2, PGD2, etc.) and
6 series 4 leukotrienes (LTA4, LTB4, LTC4, etc.) (Funk, 2001), molecules intimately
7 associated with inflammation. We therefore set out to pinpoint the processes taking
8 place in the livers of aging hApoD mice, specifically lipid accumulation, inflammation
9 modulation and prostaglandin production.

10

11 3.5 Material and methods

12 3.5.1 Animals

13 Experimental procedures were approved by the Animal Care and Use Committee
14 (CIPA) of the University of Quebec in Montreal (UQAM). Animals were housed at 24
15 \pm 1°C in a 12h light/ 12h dark cycle and fed a standard rodent chow (Charles River,
16 #5075) ad libitum with free access to water. Tg(THY1-APOD1)1Era (hApoD) mice,
17 ex-pressing a human APOD cDNA under a 3.5kb fragment of the human THY1
18 promoter/enhancer region, were continuously backcrossed with C57BL/6 mice to
19 maintain a heterozygous transgenic population. Experiments were carried out on males
20 aged 3, 6, 9 and 12 months. Mice were first anaesthetised by inhalation of 5% isoflurane
21 and then euthanized by CO₂ inhalation. Blood was promptly collected (~500 μ L).
22 Livers were collected, washed in PBS, flash frozen in liquid nitrogen and stored at
23 -80°C. Mouse genotyping was performed as previously described (Do Carmo,
24 Fournier, et al., 2009). DNA concentration was assessed using a NanoDrop 2000
25 (Thermo Scientific, ND2000). PCR was performed using Taq DNA polymerase

1 (Invitrogen, 18038-042) with 60ng of DNA and 10mM primers (hApoD forward: ACA
 2 AGC ATT TCA TCT TGG GAA GT and reverse: CAT CAG CTC TCA ACT CCT
 3 GGT; Actb control forward: GAT GTC ACG CAC GAT TTC CC and reverse: CCC
 4 AGC ACA CTG AAC TTA GC). PCR products were separated on 1% agarose gel and
 5 visualised after incubation in ethidium bromide 0.5µg/mL.

6 3.5.2 RNA extraction and quantitative PCR

7 Total RNA was extracted from liver samples using TRIzol Reagent (Life Technologies,
 8 15596-018) according to the manufacturer's protocol. Four µg of total RNA was then
 9 reverse transcribed to cDNA using Super Script II reverse transcriptase (Invitrogen,
 10 18064-022). Quantitative PCR (qPCR) was performed in a LightCycler 480 thermo-
 11 cycler (Roche, 05015278001). A preliminary qPCR array was per-formed using a
 12 predesigned prostaglandin 2 series biosynthesis and metabolism panel (BioRad, 100-
 13 29146) as well as a custom inflammatory balance panel (BioRad). Standard qPCR were
 14 performed with Luna Universal qPCR Master Mix and specific primers (TableA1)
 15 using Hprt as a reference gene. To help represent the inflammatory balance in hepatic
 16 tissue, a polarization index (equation below) was calculated taking into consideration
 17 M0, M1 and M2 marker expression. High values indicate a bias towards inflammation.
 18 This index was calculated for each liver.

19 *Polarisation index*

$$20 = \frac{(Cd68 + Adgre1) + (Tnfa + Il1\beta + Il6) - (Tgfb + Cd163)}{7}$$

21

1 3.5.3 Immunoblotting

2 For whole cell extractions, liver samples were homogenized in lysis buffer (50mM
3 Tris-HCl pH7.4, sucrose 250mM, 100mM NaF, 10mM sodium pyrophosphate, 1mM
4 EDTA, 1mM DTT, 1mM sodium vanadate, 1mM PMSF). Lysates were then incubated
5 30 min at 4°C, cleared by centrifugation (10,000g, 15min). The lipid layer was
6 discarded, and protein concentration was assessed by Bradford assay (Marion M.
7 Bradford, 1976). For nuclear enrichment, liver samples were first homogenized in lysis
8 buffer (10mM HEPES, 1.5mM MgCl₂, 10mM KCl, 0,5mM DTT and 0.05% NP-40,
9 pH 7.9). The nuclear fraction was precipitated by centrifugation (1500g, 10min), then
10 resuspended in a second buffer (5mM HEPES, 1.5mM MgCl₂, 0.2mM EDTA, 0.5mM
11 DTT and 26% glycerol (v/v), pH7.9) and homogenized in a Dounce tissue grinder
12 (Wheaton, 357421). Remaining cell debris were removed by centrifugation (24,000g,
13 20min). Protein concentration was assessed by Bradford assay (Marion M. Bradford,
14 1976). Proteins (20µg) were separated on SDS-PAGE and transferred on PVDF
15 membrane. Blocking was performed using 5% milk, 1h at room temperature.
16 Membranes were then incubated with primary antibodies overnight at 4°C. Dilutions
17 of the primary antibodies were of 1:50,000 for cyclophilin B (Abcam, ab16045),
18 1:1000 for PPAR γ (Abcam, ab45036), SREBP-1 (SantaCruz, sc13551), for FASN
19 (Abcam, ab22759) and NF- κ B p50 (Santa Cruz, sc7178). Primary antibodies were
20 detected using goat anti-rabbit HRP conjugated IgG antibodies (Cell Signaling Tech.,
21 7074S) at 1:1000 and visualised by using chemiluminescent HRP substrate (Millipore,
22 WBKLS0500). Amidoblack staining was used as a loading control. Briefly,
23 membranes were stained for 20min in amidoblack solution (0.1% amidoblack, 40% v/v
24 methanol and 10% v/v acetic acid) and washed 10min twice in decolouration solution
25 (40% v/v methanol and 10% v/v acetic acid). Bands were quantified by densitometry
26 using Image J software.

1 3.5.4 Enzyme-linked immunosorbent assays

2 Liver extracts were prepared by homogenizing tissues in cold lysis buffer (50mM Tris-
3 HCl pH 7.3, 150mM NaCl, 5mM EDTA, 0.2% Triton X-100, 2mM sodium
4 orthovanadate and 10% cOmplete protease inhibitor). Lysates were then incubated
5 30min at 4°C and cleared by centrifugation (10000g, 15min). The concentration of
6 PGE2 and 15d-PGJ2 were then measured using specific ELISA kits (Enzo Life
7 Sciences, PGE2: ADI-900-001, 15d-PGJ2: ADI-900-023) according to the
8 manufacturer's protocol. For PGD2, liver extracts were homogenised in cold PBS.
9 PGD2 was then measured using the prostaglandin D2-MOX Express ELISA Kit
10 (Cayman chemical, 500151).

11

12 3.5.5 Histology

13 Frozen liver sections were prepared by first freezing samples in NEG-50 (Thermo
14 Scientific, 6502) and cutting 4µm slices with a cryostat (Leica, CM1950). Sections
15 were then fixed in PBS containing 4% paraformaldehyde. To visualise neutral lipids,
16 sections were stained with 0.5% Oil Red O in isopropanol and counterstained with
17 0.5% hematoxylin. Lipid accumulation was quantified by determining the number of
18 red pixels (Oil Red O-stained lipids) relative to blue pixels (hematoxylin-stained nuclei)
19 using the color threshold function of Image J software. Paraffin sections were also
20 prepared by fixing liver samples in Bouin's solution overnight at room temperature
21 before paraffin embedding. Microtome 8µm sections were then stained with Masson's
22 Trichrome. Histology scoring for macrovesicular and microvesicular steatosis, in
23 addition to inflammation foci and fibrosis was performed by an independent
24 hepatologist following a Kleiner scoring system adapted for rodents (Kleiner et al.,
25 2005; Liang et al., 2014).

1

2 3.5.6 Fatty acid profiling

3 Fatty acid composition was measured by a modified gas chromatography–mass
4 spectrometry (GC–MS) method, as previously described (Gelinias et al., 2011). Briefly,
5 total lipids were extracted from plasma with a mixture of methyl tert-butyl ether,
6 methanol and water (Matyash, Liebisch, Kurzchalia, Shevchenko, & Schwudke, 2008).
7 For liver, pulverized tissues (25mg) were incubated overnight at 4°C in a solution of
8 chloroform/methanol (2:1) containing 0.004% butylated hydroxytoluene, filtered
9 through gauze and dried under nitrogen gas. Plasma and liver fatty acids were analyzed
10 as their fatty acid methyl derivatives (FAME) after direct transesterification with acetyl
11 chloride/methanol (Lepage & Roy, 1986). Injections (2µL for plasma and 1µL for liver
12 samples) were performed onto an Agilent 7890B gas chromatograph equipped with a
13 Select FAMECP7420 capillary column (100m; 250µm inner diameter; 230µm
14 thickness) coupled with a 5977A Mass Selective Detector operated in positive chemical
15 ionisation mode using ammonia as reagent gas. Fatty acids were identified according
16 to their retention time and m/z, and their concentration was calculated using a mix of
17 internal and external labelled standards added to liver and plasma samples at known
18 concentrations. The concentration of fatty acid is reported relative to total fatty acid
19 content (%).

20

21 3.5.7 Statistics

22 Results are presented as mean ± standard error mean unless otherwise stated. Statistical
23 analysis was performed with GraphPad 5 software. Statistically significant differences
24 from control values (p-value < 0.05 or less) were determined by a one-tailed Student's

1 t-test. A Welch's correction was applied when variances between groups were unequal
2 (as determined by the Fisher's f-test).

3

4 3.6 Results

5 3.6.1 Hepatic lipid accumulation is apparent at 9 months of age

6 We first examined the livers of wild type (WT) and transgenic hApoD mice at every
7 trimester leading up to 12 months of age. Neutral lipid accumulation (Fig. 3.1A) and
8 macrovesicular steatosis (Fig. 3.1B) were already apparent in transgenic livers at 9
9 months and increased during the next trimester. Several transgenic hepatic samples
10 reached score 3 macrovesicular steatosis at 12 months, while WT animals of the same
11 age only exhibited early signs of age-related steatosis (grade 1; Fig. 3.1B). No
12 difference in microvesicular steatosis or fibrosis scores were observed between WT
13 and hApoD livers (data not shown).

14

15 3.6.2 Lipid uptake increases at 6 months

16 Next, we examined the effect of hApoD overexpression on hepatic lipid synthesis by
17 evaluating activation of the transcription factor SREBP-1 and expression of its target
18 FASN. The maturation by cleavage of SREBP-1, the master regulator of hepatic
19 lipogenesis, was not significantly modulated in hApoD mice livers compared to WT
20 controls, except for a slight activation at 12 months (Fig. 3.2A). FASN levels were also
21 fairly stable, except for a slight increase at 3 months (Fig. 3.2B). We also investigated
22 hepatic lipid uptake via the evaluation of PPAR γ and Cd36 levels. PPAR γ protein
23 levels were increased in nucleus-enriched fractions of hApoD livers starting at 6

1 months (Figs. 3.2C and 3.A1). This was reflected by an overexpression of its
2 transcription target Cd36 beginning at the same trimester (Fig. 3.2D). These results
3 further establish lipid uptake via PPAR γ activation as the mechanism by which fatty
4 acids accumulate in the livers of hApoD mice (Labrie et al., 2015).

5

6 3.6.3 Anti-inflammatory profile at 6 months

7 Despite the pronounced hepatic steatosis established by 12 months of age, hApoD mice
8 do not develop the steatohepatitis that is typically associated with it (Do Carmo,
9 Fournier, et al., 2009). To better understand this unexpected phenomenon, we
10 measured the expression of macrophage polarization biomarkers within liver tissue at
11 every trimester. There was a trend towards M1 pro-inflammatory polarization at 3 and
12 9 months, a trend towards M2 anti-inflammatory polarization at 6 months and a mostly
13 neutral profile at 12 months. These trends were particularly pronounced at 6 and 9
14 months, as revealed by their respective polarization indexes (Fig. 3.3A). While
15 transgenic livers appeared to experience episodes of pro-inflammatory polarization,
16 these did not result in an increased macrophage recruitment. In fact, the severity of
17 inflammatory foci was never elevated relative to WT controls (Fig. 3.3B). Interestingly,
18 no inflammatory foci could be observed in 6-month-old M2-polarized hApoD livers.
19 This correlated with a strong reduction of the nuclear recruitment of NF- κ B (p50) at 6
20 months (Fig. 3.3C). We also observed a moderate reduction of nuclear NF- κ B (p50) at
21 12 months.

22

1 3.6.4 Overproduction of prostaglandin D2 and 15d-PGJ2

2 We next examined whether ARA accumulation in aging hApoD transgenic livers
3 (Labrie et al., 2015) translated into an overproduction of prostaglandins. A preliminary
4 qPCR screen (Fig. 3.A1), guided our investigation towards the production of two
5 specific prostaglandins: PGE2 and PGD2. We also chose to investigate 15d-PGJ2, a
6 non-enzymatic derivative of PGD2, because of its potent anti-inflammatory and pro-
7 lipogenic properties (Bell-Parikh et al., 2003; Hashimoto, Ethridge, Saito, Rajaraman,
8 & Evers, 2003; Scher & Pillinger, 2005). We observed an increase in the hepatic
9 expression of COX-2 (*Ptgs2* gene) and L-PGDS (*Ptgds* gene) at 6 months (Fig. 3.4A),
10 two enzymes participating in the conversion of ARA into PGD2. Accordingly, we
11 observed a significant increase of the anti-inflammatory prostaglandin 15d-PGJ2 at 6
12 months (Fig. 3.4B). We also observed increased PGD2 levels at 12 months. The pro-
13 inflammatory prostaglandin PGE2 remained unmodulated at all trimesters, a result
14 consistent with our previous published data on 12-month-old hApoD livers (Labrie et
15 al., 2015).

16

17 3.6.5 Omega fatty acid accumulation during aging

18 To better understand the steatosis process in hApoD livers, we measured a large panel
19 of fatty acids in aging hApoD and WT livers, including several saturated, mono-
20 unsaturated and omega (ω)-3/ 6/ 9 fatty acids (Figs. Supp. 3.2 and 3.3). In WT livers,
21 the proportion of [saturated+ mono-unsaturated] fatty acids among the total pool of
22 fatty acids increased progressively with age (Fig. 3.5A) while the proportion of [ω -
23 3+ ω -6] fatty acids diminished (Fig. 3.5B). This was not observed in transgenic fatty
24 livers, as these fatty acid proportions were similar at all ages. In addition, every ω -3
25 and ω -6 fatty acid quantified in our experiment was elevated in 12-month-old hApoD
26 fatty livers compared to WT controls (Fig. 3.5C). Interestingly, in terms of

1 inflammation potential, the ω -3/ ω -6 fatty acid ratio in hApoD livers was lower at 3
2 months and higher at 12months (Fig. 3.5D). As ApoD is a secreted protein (Balbín et
3 al., 1990; di Masi, Trezza, Leboffe, & Ascenzi, 2016; Ong et al., 1997; Rassart et al.,
4 2000), we hypothesized that its overexpression might modify circulating lipid levels.
5 Indeed, compared to WT mice, the plasmatic ω -6 fatty acids ARA and dihomo- γ -
6 linoleic acid (DGLA) were lowered while the ω -3 docosapentaenoic acid (DPA) was
7 slightly increased in 12-month-old hApoD mice (Fig. 3.5E).

8

9 3.7 Discussion

10 Our previous study has implicated an increase in lipid uptake associated with PPAR γ
11 activation in the development of hepatic steatosis in hApoD mice (Labrie et al., 2015).
12 Fatty acid accumulation is typically associated with hepatic inflammation
13 (steatohepatitis) (Suzuki & Diehl, 2017). The goal of this new study was to provide a
14 better understanding of the intriguing absence of inflammation in the hApoD fatty liver.
15 A model explaining our findings is presented in Fig. 3.6. The earliest event we
16 uncovered was the production of 15d-PGJ2 in 6-month-old hApoD livers (Fig. 3.4B),
17 a full trimester before hepatic lipid accumulation was detectable by microscopy
18 analysis. This prostaglandin being a strong PPAR γ agonist (Kliewer et al., 1997b), 15d-
19 PGJ2 could be directly responsible for PPAR γ activation in hApoD livers. Despite the
20 fact that 15d-PGJ2 was only transiently overproduced, PPAR γ remained activated in
21 the following trimesters. The Cd36 gene is transcriptionally activated by PPAR γ
22 (Wheeler & Gekakis, 2014). Consequently, increased expression of CD36 which
23 mediates the cellular uptake of long chain fatty acids (LCFA) and poly-unsaturated
24 fatty acids (PUFA) (Baillie, Coburn, & Abumrad, 1996; Pepino, Kuda, Samovski, &
25 Abumrad, 2014) leads to increased LCFA and PUFA concentration that can in turn,

1 activate PPAR γ (Grygiel-Gorniak, 2014). Therefore, increased CD36 expression could
2 result in a positive feedback loop maintaining PPAR γ activation after 6 months. The
3 IKK/NF- κ B pathway plays an important role in liver inflammation (Farrell, van
4 Rooyen, Gan, & Chitturi, 2012). Prostaglandin 15d-PGJ2 can inhibit NF- κ B signaling
5 through PPAR γ -dependent and -independent mechanisms. Agonist-bound PPAR γ
6 reduces NF- κ B transcriptional activity in a dose-dependent manner (Remels et al.,
7 2009). Moreover, 15d-PGJ2 can disrupt NF- κ B signaling through covalent
8 modification of a cysteine residue (Michael addition reaction) in IKK and in the DNA
9 binding domain of NF- κ B itself (Daniel S. Straus et al., 2000; Suh et al., 2018). The
10 overproduction of 15d-PGJ2 was indeed concomitant to a strong inhibition of NF- κ B
11 (p50) nuclear recruitment at 6 months (Fig. 3.3C). By inhibiting NF- κ B signaling, 15d-
12 PGJ2 production could contribute to the strong anti-inflammatory profile observed in
13 hApoD livers at 6 months, where the severity of inflammation foci tended to be even
14 lower than in WT livers (Fig. 3.3B). In fact, injection of 15d-PGJ2 was previously
15 shown to inhibit hepatic inflammation in vivo (Alves, de Melo, Fraceto, de Araujo, &
16 Napimoga, 2011; K. Chen et al., 2016). PGD2 is an unstable compound and the
17 molecular precursor of 15d-PGJ2 and other J2 prostaglandins through non-enzymatic
18 reactions. We found that PGD2 levels seemed to be higher at 6 months and were
19 significantly higher at 12 months in hApoD mice livers. Like 15d-PGJ2, PGD2 plays
20 anti-inflammatory functions in the liver (Fujita & Narumiya, 2016). Thus, PGD2 could
21 help promote an anti-inflammatory environment in 12-month-old hApoD mice livers.
22 Another mitigating factor towards the advent of steatohepatitis is the fact that a great
23 proportion of fatty acids identified in the hApoD fatty liver were ω -6 and ω -3 PUFA.
24 Lipotoxicity is typically associated with accumulation of saturated fatty acids such as
25 palmitate (Hetherington et al., 2016) and mono-unsaturated fatty acids like oleate
26 (Kitaura, Inoue, Kato, Matsushita, & Shimomura, 2015). Relative to WT controls,
27 transgenic fatty livers accumulate a smaller proportion of saturated and mono-
28 unsaturated LCFA in favour of ω -6 and ω -3 fatty acids (Fig. 3.5A & B). In addition, as

1 ω -3 fatty acids possess anti-inflammatory properties (Jump, 2002; Yates, Calder, & Ed
2 Rainger, 2014). The higher ω -3/ ω -6 ratio presumably contributes to inflammation
3 suppression in hApoD livers (Fig. 3.5C). The circulating lipid transporter ApoD could
4 directly contribute to fatty acid accumulation in transgenic livers. ApoD has been
5 shown to be internalized in several cell types (Do Carmo et al., 2007; Leung et al.,
6 2004; Najyb et al., 2015), a process that could participate in intracellular lipid
7 accumulation. ARA, the ApoD ligand with the highest known affinity (Dassati et al.,
8 2014; Rassart et al., 2000), is accordingly depleted in plasma and accumulates in
9 hApoD liver tissue. However, transgenic livers accumulated not only ARA but also all
10 the other ω -3 and ω -6 fatty acids measured in our study (Fig. 3.5D). This suggests that
11 ApoD could bind many different ω fatty acids and transport them to the liver. In
12 accordance with this concept, DGLA (C20:3n6), which is structurally similar to ARA
13 (C20:4n6), was also depleted from hApoD plasma (Fig. 3.5E).

14 The production of 15d-PGJ2 in 6-month-old hApoD livers was presumably due to the
15 concomitant expression of COX-2 and L-PGDS (Fig. 3.4A). However, the events
16 responsible for the increase in COX-2 and L-PGDS expression are still not known. One
17 possibility is that a sub-population of liver tissue cells are first affected by circulating
18 ApoD in transgenic mice. Endothelial cells would be the first liver cells to come in
19 contact with circulating lipid-charged ApoD. Hepatic endothelial cells express L-
20 PGDS (*Ptgds* gene) (Miyagi, Miwa, Takahashi-Yanaga, Morimoto, & Sasaguri, 2005;
21 Parmar et al., 2006; Parmar et al., 2005; Roman & Pekkan, 2012; Taba et al., 2000).
22 Therefore, 15d-PGJ2 over-production could be the result of ARA transformation
23 within endothelial cells. Hepatocytes also express L-PGDS (Uhlen et al., 2015a, 2015b),
24 but despite their prevalence in liver tissue (roughly 92.5% of liver mass), they only
25 produce a small proportion of total hepatic eicosanoids (12%) compared to endothelial
26 and Kupffer cells (23% and 65%, respectively) (Kuiper, Zijlstra, Kamps, & van Berkel,
27 1988). While Kupffer cells are known to produce 15d-PGJ2, their ability to do so is not

1 dependent upon the *Ptgds* gene but upon *Hpgds* (Urade, Ujihara, Horiguchi, Ikai, &
2 Hayaishi, 1989; Zigmond et al., 2014) which was not modulated in hApoD livers.
3 Together, these considerations highlight the possibility that hepatic endothelial cells
4 are implicated in the early inflammatory and metabolic processes taking place in the
5 hApoD mouse liver (Fig. 3.7). The expression of COX-2 and L-PGDS is dependent on
6 several transcription factors, one of which is NF- κ B. However, the mRNA
7 overexpression observed in hApoD livers at 6months (Fig. 3.4A) cannot be dependent
8 on NF- κ B since it is underactivated (Fig. 3.3C). Other transcription factors such as AP-
9 1, AP-2 and CREB also regulate COX-2 (Harper & Tyson-Capper, 2008) and L-PGDS
10 (Fujimori et al., 2003) expression. Exogenous ARA can induce AP-1 transcriptional
11 activity without involving the NF- κ B pathway (Bécuwe, Bianchi, Didelot, Barberi-
12 Heyob, & Dauça, 2003). Additionally, 15d-PGJ2 can induce COX-2 overexpression
13 by activation of AKT and subsequently AP-1 (Kim et al., 2008). Following the model
14 proposed in Fig. 3.7, ARA accumulation in endothelial cells could activate COX-2 and
15 L-PGDS overexpression through activation of transcription factors (such as AP-1),
16 resulting in PGD2 and 15d-PGJ2 overproduction. In conclusion, we have uncovered
17 processes through which ApoD can modulate hepatic prostaglandin production and
18 omega fatty acid accumulation, resulting in a non-inflammatory hepatic steatosis in
19 transgenic hApoD mice.

20 **Author contributions** FD performed the experiments. FD and KFB wrote the
21 manuscript. CM and ER edited the manuscript and supervised the study.

22 **Disclosure statement** The authors declare that they have no competing interests.

23 **Transparency document** The Transparency document associated with this article can
24 be found, in online version.

1 3.8 Acknowledgements

2 We are grateful to Dr. Natasha Patey (hepatologist at Sainte-Justine Hospital, Montreal)
3 for the independent grading of steatosis and inflammation on histology slides of hepatic
4 tissue.

5

6

7

8 3.9 Figure legends

9 **Fig.3.1. ApoD overexpression increases hepatic lipid accumulation.** Histological
10 analysis of hepatic tissue from 3-, 6-, 9-, and 12-month-old wild type (WT) and
11 transgenic hApoD mice (n=7-8 mice per genotype and per age). (A) Oil Red O staining
12 with hematoxylin counterstain. Scalebar = 25µm. Right panel: Quantification of Oil
13 Red O staining. (B) Masson's trichrome staining. Arrows indicate macrovesicular
14 steatosis. Scalebar = 25µm. Right panel: Quantification of macrovesicular steatosis
15 (Kleiner score modified for rodents) presented as box plots with overlaid data points.
16 *p< 0.05, **p< 0.01 relative to WT controls.

17

18 **Fig.3.2. Steatosis in hApoD mice is linked to PPAR γ activation starting at 6months.**
19 Protein and mRNA markers of lipogenesis (A, B) and lipid uptake (C, D) from 3-, 6-,
20 9-, and 12-month-old wild type (WT) and transgenic hApoD mouse livers (n = 7–8
21 mice per genotype and per age). SREBP-1 activation in A is evaluated by determining

1 the mature form/ total protein ratio. Representative Western blots are provided for each
2 protein target: SREBP-1 precursor form (~120kDa), SREBP-1 mature form (~68kDa),
3 Cyclophilin B loading control, FASN and PPAR γ . *p< 0.05, **p< 0.01 relative to WT
4 controls.

5

6 **Fig.3.3. Hepatic inflammatory polarization in hApoD mice.** Evaluation of
7 inflammation markers in 3-, 6-, 9-, and 12-month-old wild type (WT) and transgenic
8 hApoD mouse livers (n = 7–8 mice per genotype and per age). (A) Variation in
9 macrophage polarization (M0 and M1, or M2) assessed via hepatic mRNA levels from
10 hApoD mice relative to WT mice of the same age. Green indicates anti-inflammation
11 polarization. Red indicates pro-inflammation polarization. When relevant, the p-value
12 is provided. Bottom panel: Polarization index combining the contribution of all
13 inflammation markers probed. (B) Quantification of macrophage recruitment foci in
14 Masson's trichrome-stained liver slices (Kleiner score modified for rodents). Bottom
15 panel: Representative picture of inflammatory foci (highlighted in green). Scalebar =
16 25 μ m. (C) Nuclear recruitment of NF- κ B (p-50) assessed in nuclear enriched liver
17 fractions. Representative Western blots are provided for each time points. *p< 0.05,
18 **p< 0.01, ***p< 0.001 relative to WT controls.

19

20 **Fig.3.4. Hepatic production of anti-inflammatory 15d-PGJ2 in 6-month-old**
21 **hApoD mice.** Evaluation of prostaglandin production in 3-, 6-, 9-, and 12-month-old
22 wild type (WT) and transgenic hApoD mouse livers (n = 7–8 mice per genotype and
23 per age). (A) Expression of key enzymes in prostanoïd synthesis. (B) Levels of
24 prostaglandins PGE2, PGD2 and 15d-PGJ2. *p< 0.05 relative to WT controls.

1

2 Fig.3.5. ApoD overexpression modulates omega acid hepatic content at 12 months.

3 Evaluation of fatty acid proportions in 3-, 6-, 9-, and 12-month-old wild type (WT) and
4 transgenic hApoD mice (n = 3 mice per genotype and per age). (A) Proportion of
5 hepatic [saturated + mono-unsaturated] fatty acids relative to total fatty acids. (B)
6 Proportion of hepatic [ω -3 + ω -6] fatty acids relative to total. (C) Ratio of hepatic ω -3
7 versus ω -6 fatty acids. (D) Proportion of hepatic ω -3 and ω -6 fatty acids relative to total
8 fatty acids at 12 months. (E) Plasma concentration of ω -3 and ω -6 fatty acids at 12
9 months. Fatty acids (FA) measured included: linoleic acid (LA), γ -linoleic acid (GLA),
10 dihomo- γ -linoleic acid (DGLA), arachidonic acid (ARA), α -linolenic acid (ALA),
11 eicosapentaenoic acid (EPA), docosapentaenoic acid (DPA) and docosahexaenoic acid
12 (DHA). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

13 Fig.3.6. Model of inflammation control during the development of hepatic

14 **steatosis in hApoD mice.** The overproduction of 15d-PGJ2 at 6 months could activate
15 the PPAR γ transcription factor and trigger CD36 expression. CD36 mediates hepatic
16 lipid uptake, which could create a feedback loop maintaining PPAR γ activation after
17 6 months. Inflammation could be suppressed by 15d-PGJ2-mediated inhibition of the
18 IKK/NF- κ B pathway. The preferential accumulation of ω -3 fatty acids by 12 months of
19 age could also contribute to inflammation control. Hepatic macrophage polarization is
20 represented along the timeline arrow: green indicates anti-inflammation polarization
21 and red indicates pro-inflammation polarization. Yellow arrows indicate major anti-
22 inflammatory contributions at relevant trimesters.

23 Fig.3.7. Cellular model for hepatic production of 15d-PGJ2 in response to ApoD

24 **overexpression.** Considering ApoD's capacity to bind ARA, it is highly plausible that
25 its overexpression increases ARA transport to the liver. ARA import within hepatic

1 endothelial cells could result in 15d-PGJ2 production and diffusion, activating lipid
2 uptake in hepatocytes as well as promoting M2 anti-inflammatory polarization in
3 Kupffer cells and/ or invading monocytes/ macrophages.

4 **Supplementary Figure 1: Preliminary qPCR array panel.** Preliminary screening of
5 hepatic mRNA gene expression in 6- and 12-month-old hApoD mice compared to wild
6 type (WT) control (n=1-2 mice per age). The panel includes important genes regulating
7 inflammatory balance and prostaglandin synthesis.

8 **Supplementary Figure 2: Additional lipids included in the GC-MS panel.**
9 Evaluation of hepatic fatty acid proportions relative to total fatty acids in 3-, 6-, 9-, and
10 12-month-old wild type (WT) and transgenic hApoD mice (n=3 mice per genotype and
11 per age). Predominant hepatic saturated, mono-unsaturated and ω -9 fatty acids were
12 measured (A-D). Fatty acids measured included: myristic acid (C14:0), palmitic acid
13 (C16:0), palmitoleic acid (C16:1n7), margaric acid (C17:0), stearic acid (C18:0), oleic
14 acid (C18:1n9), vaccenic acid (C18:1n7), nonadecanoic acid (19:0) and mead acid
15 (C20:3n9). * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001

16

17 **Supplementary Figure 3: Effect of age on hepatic lipid accumulation and**
18 **composition.** Evaluation of fatty acid (A) concentration and (B) proportions relative to
19 total fatty acids in 3-, 6-,9-, and 12-month-old wild type (WT) and transgenic hApoD
20 mice (n=3 mice per genotype and per age). Fatty acids (FA) measured included:
21 myristic acid (C14:0), palmitic acid (C16:0), palmitoleic acid (C16:1n7), margaric acid
22 (C17:0), stearic acid (C18:0), oleic acid (C18:1n9), vaccenic acid (C18:1n7),
23 nonadecanoic acid (19:0), mead acid (C20:3n9), linoleic acid (LA), γ -linoleic acid
24 (GLA), dihomo- γ -linoleic acid (DGLA), arachidonic acid (ARA), α -linolenic acid

1 (ALA), eicosapentaenoic acid (EPA), docosapentaenoic acid (DPA) and
2 docosahexaenoic acid (DHA). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

3

4

5

6

7

8

9

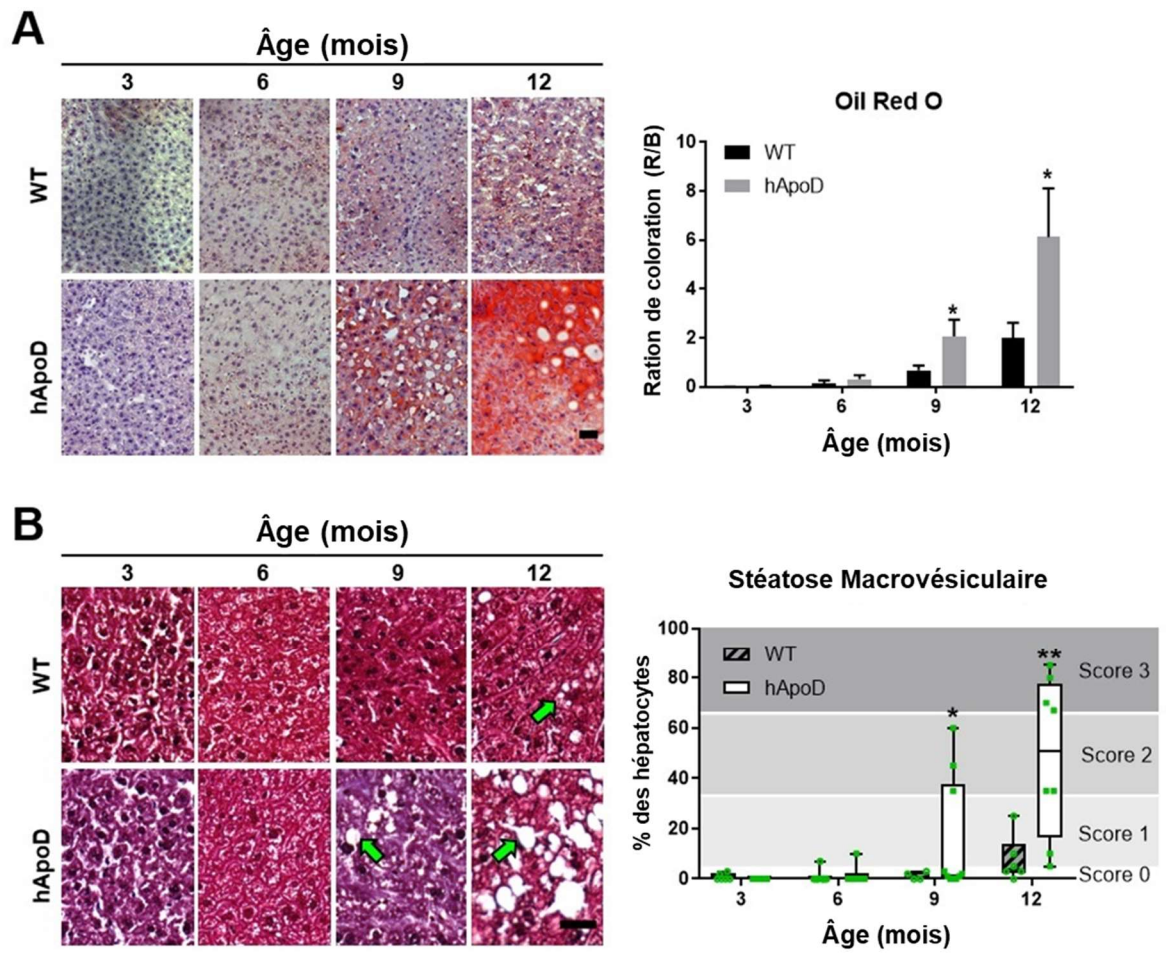
10

11

12

13

Figure 3.1



1

2

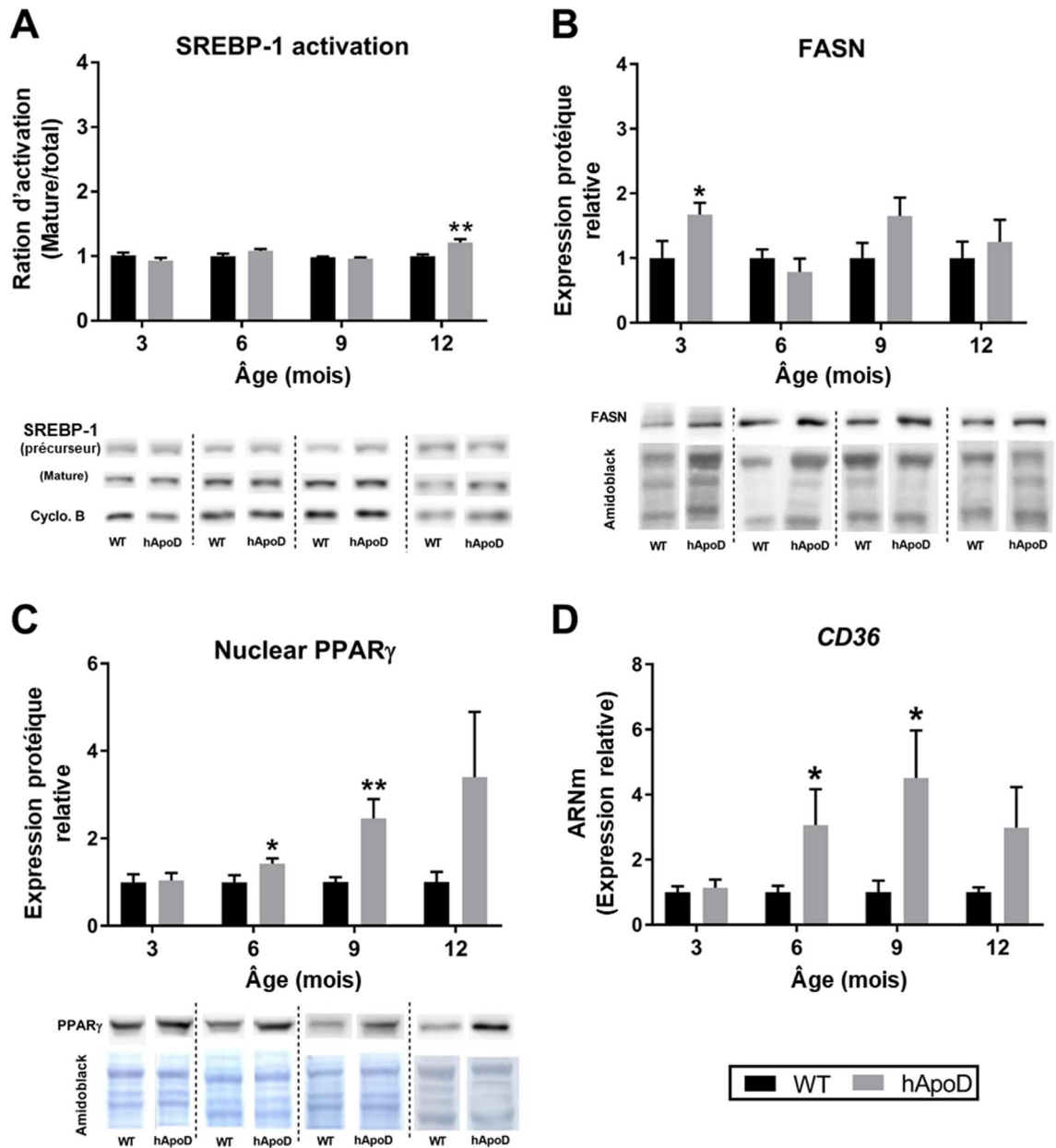
3

4

5

6

Figure 3.2

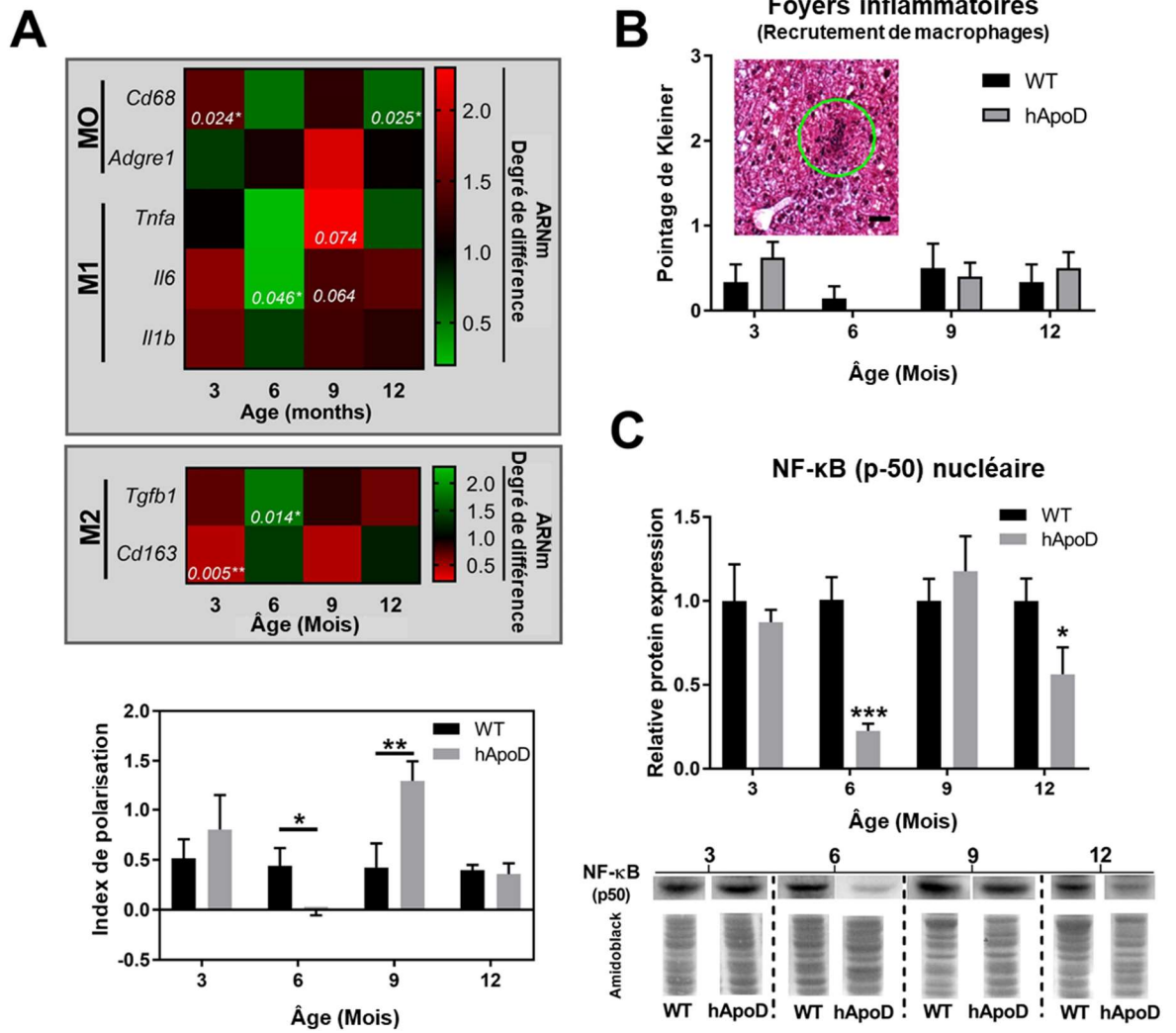


1

2

3

Figure 3.3



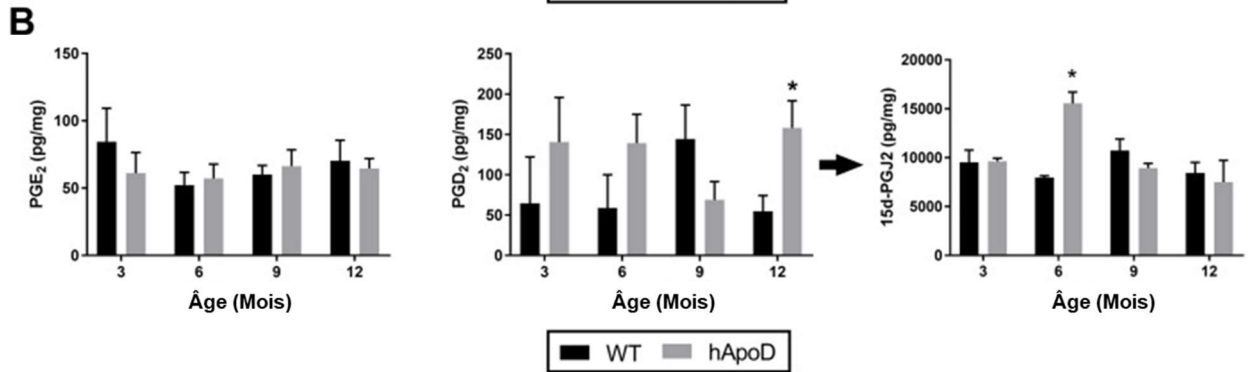
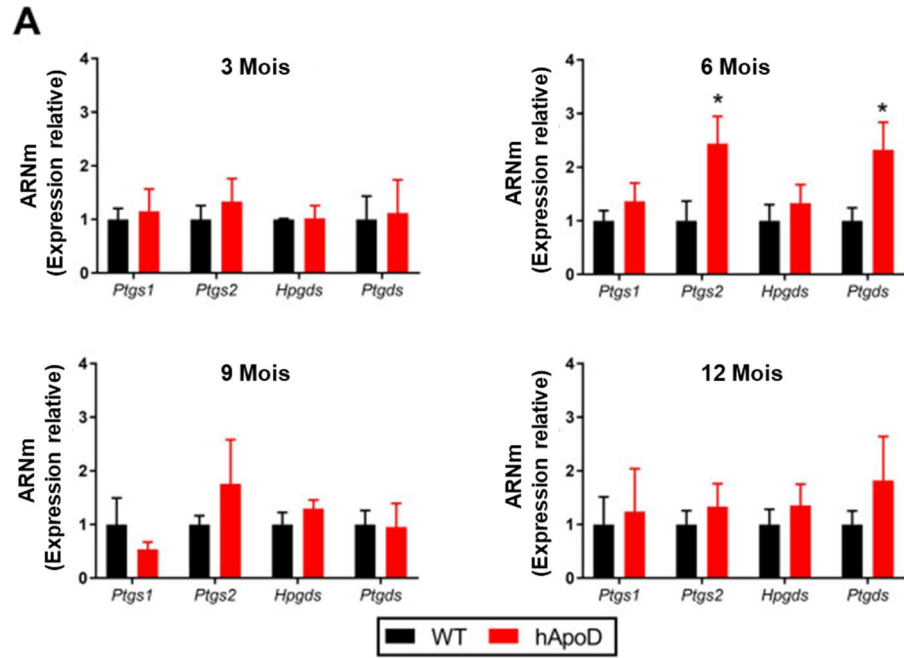
1

2

3

4

5 **Figure 3.4**



1

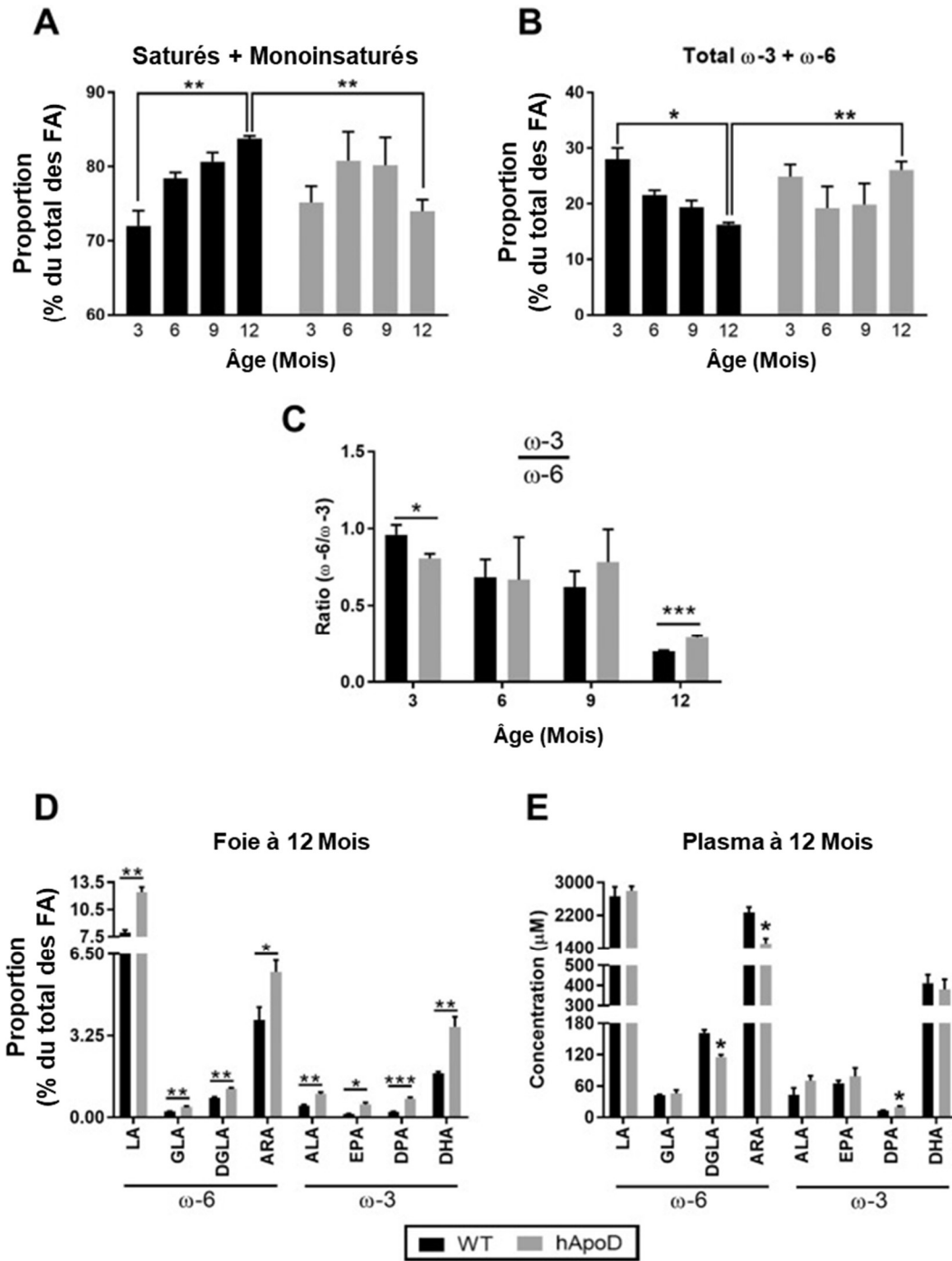
2

3

4

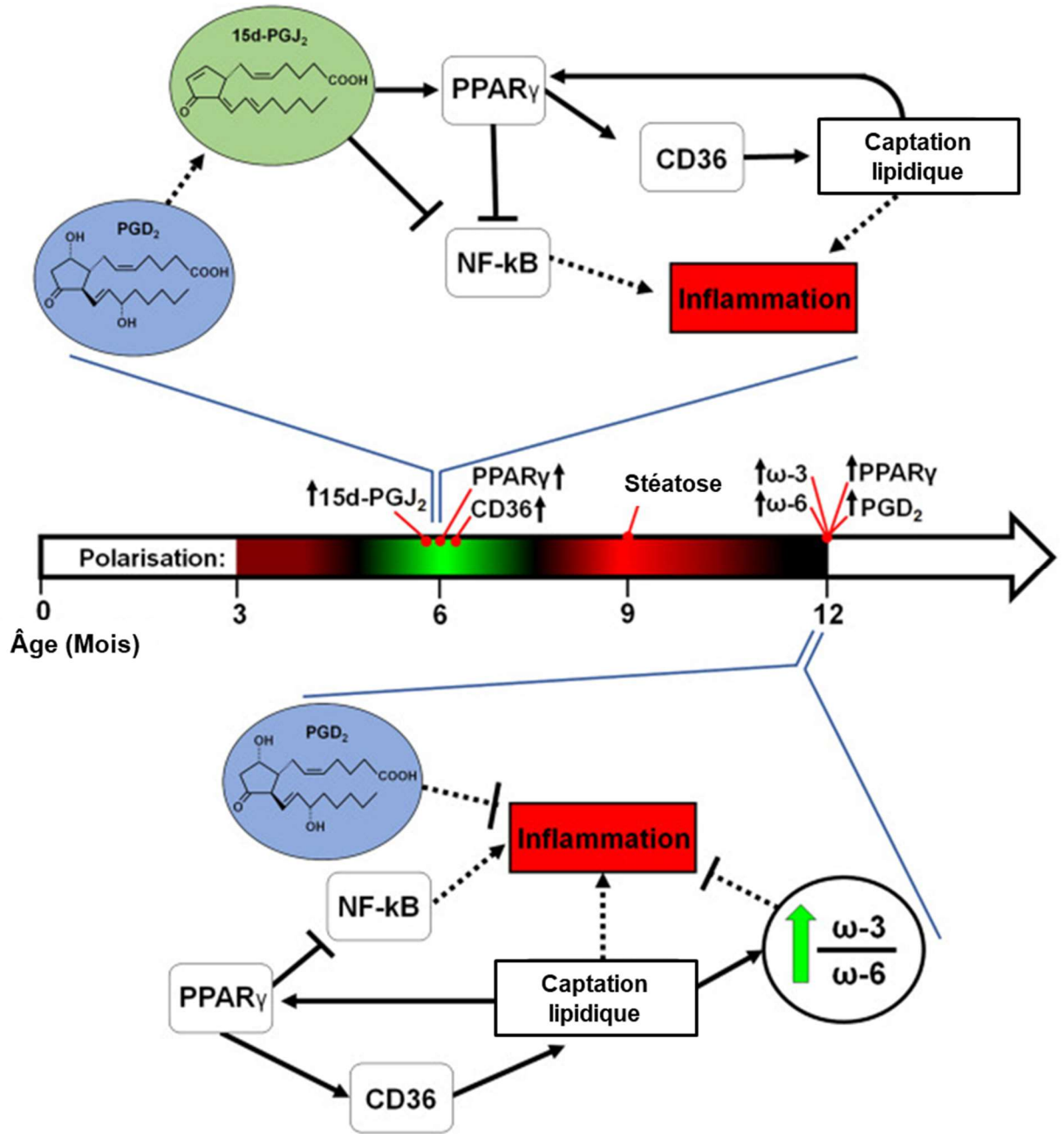
5

6 **Figure 3.5**



1

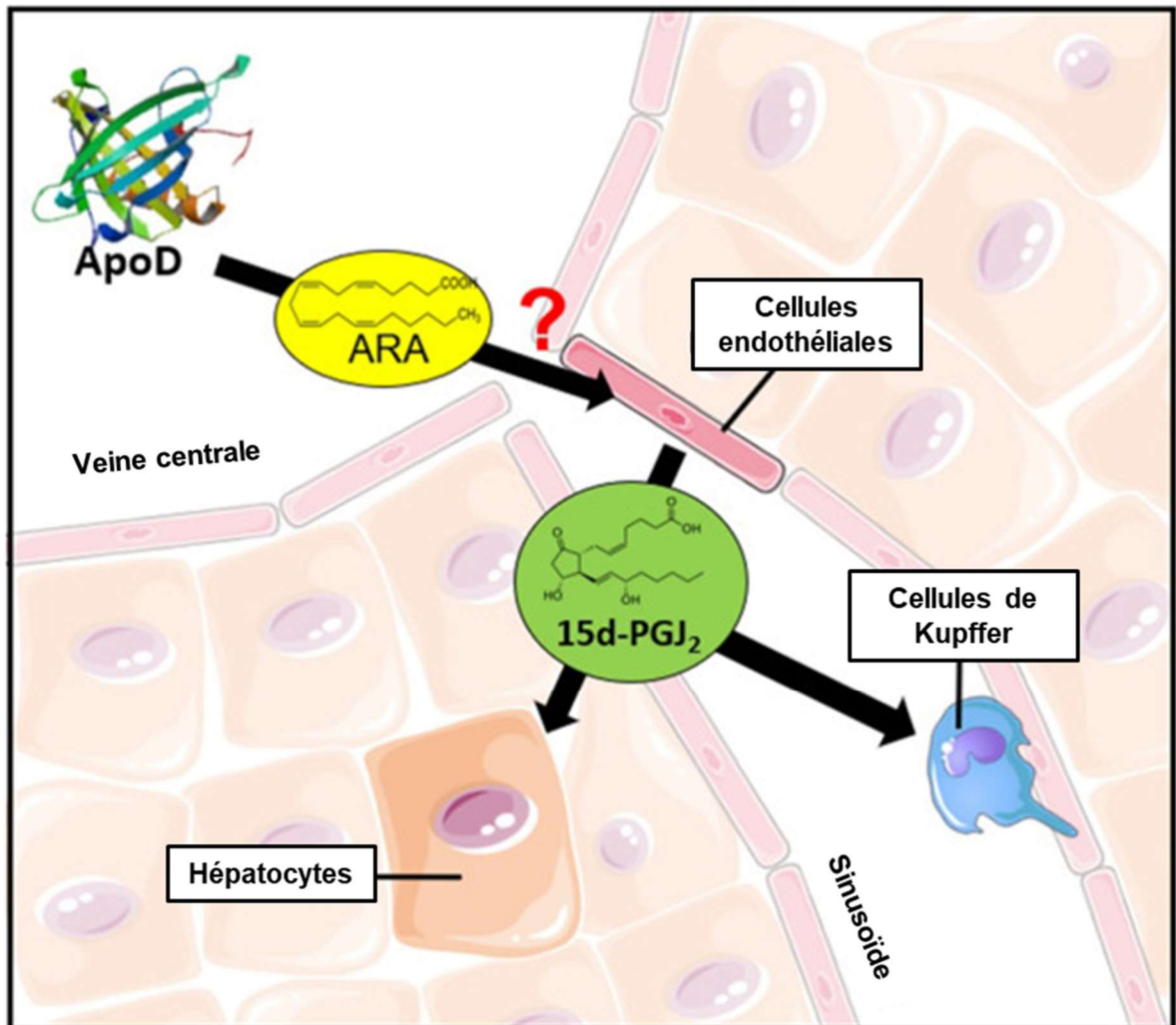
2 Figure 3.6



1

2

3 **Figure 3.7**



1

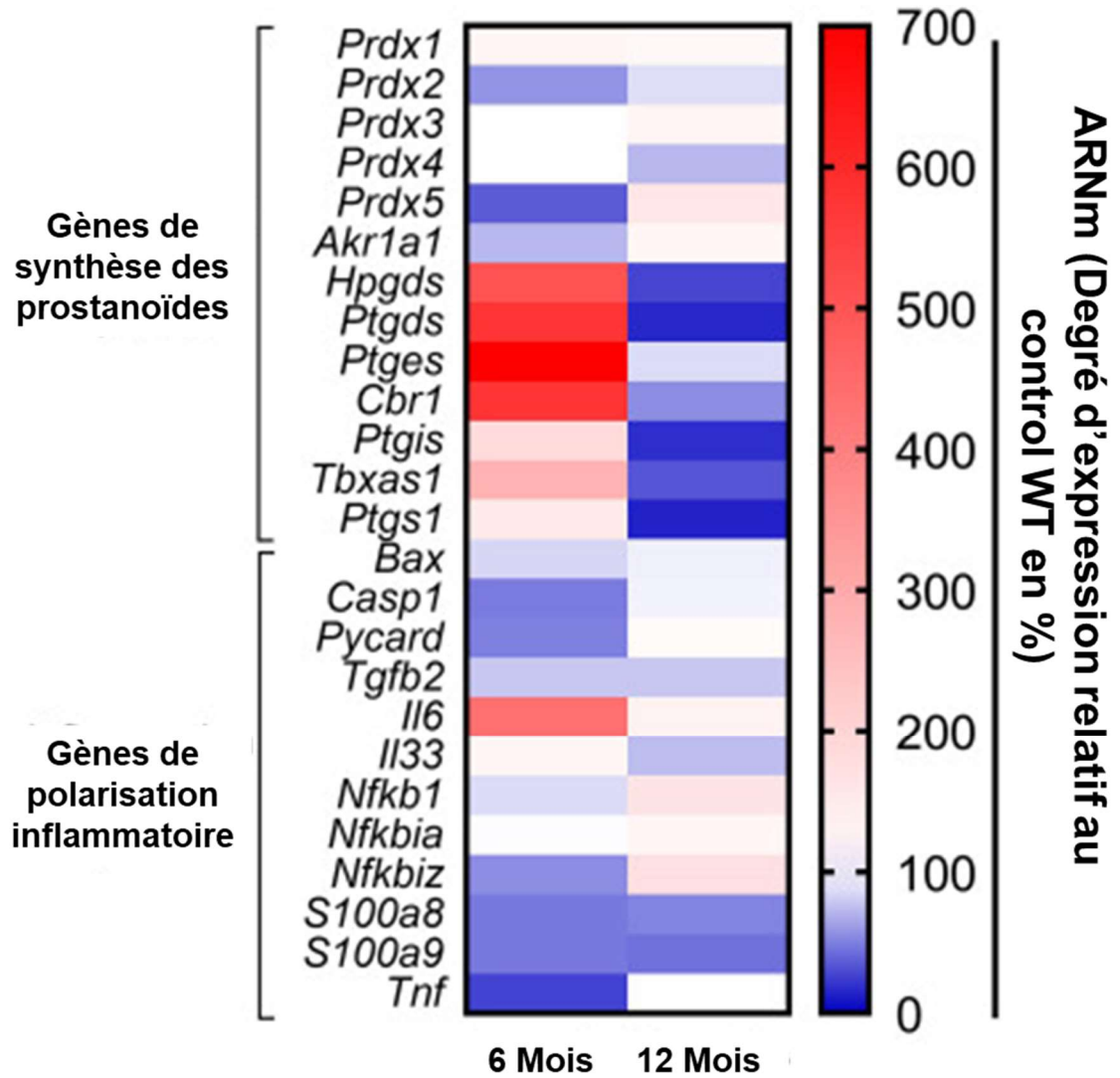
2

3

4

5

6 **Figure Supp. 3.1**



1

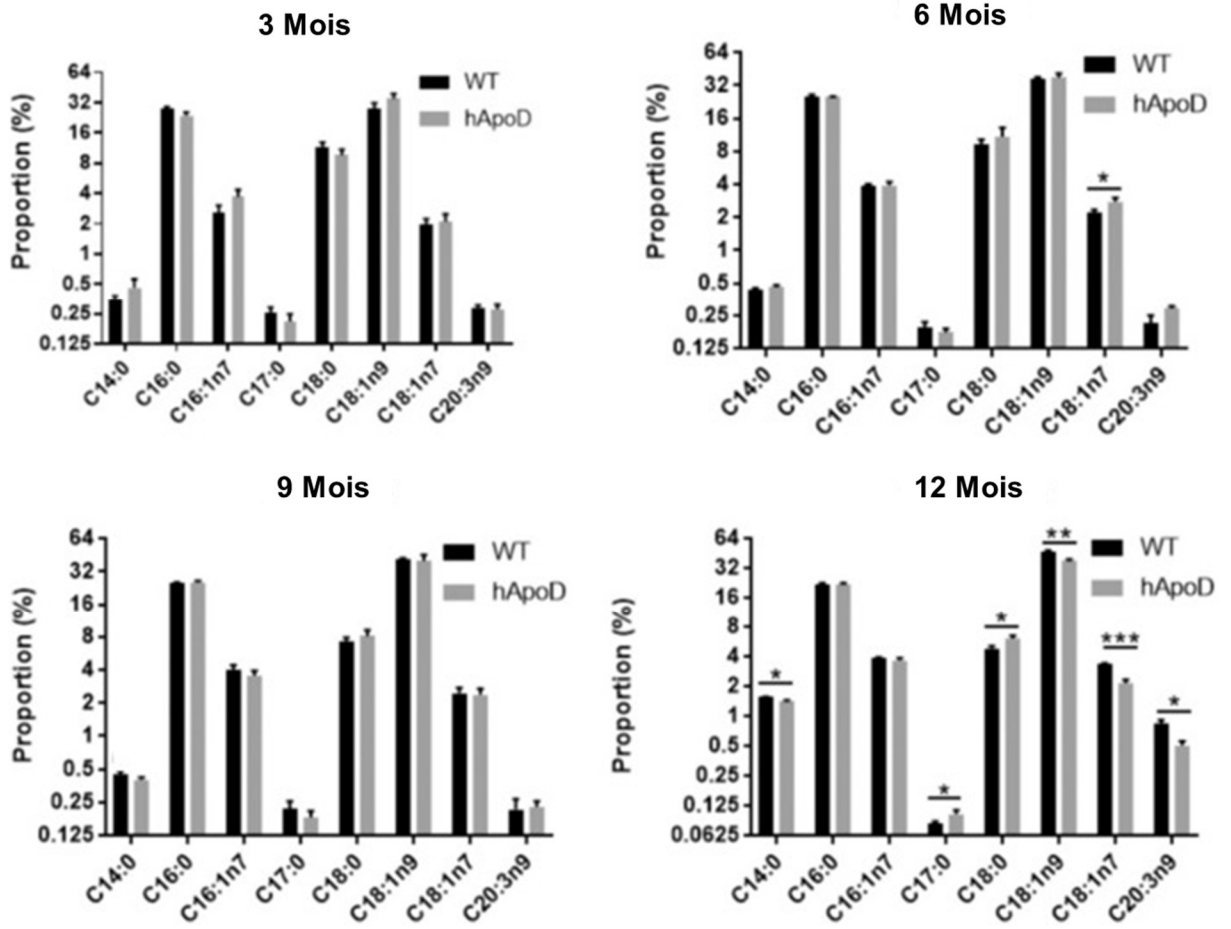
2

3

4

5

1

2 **Figure supp. 3.2**

3

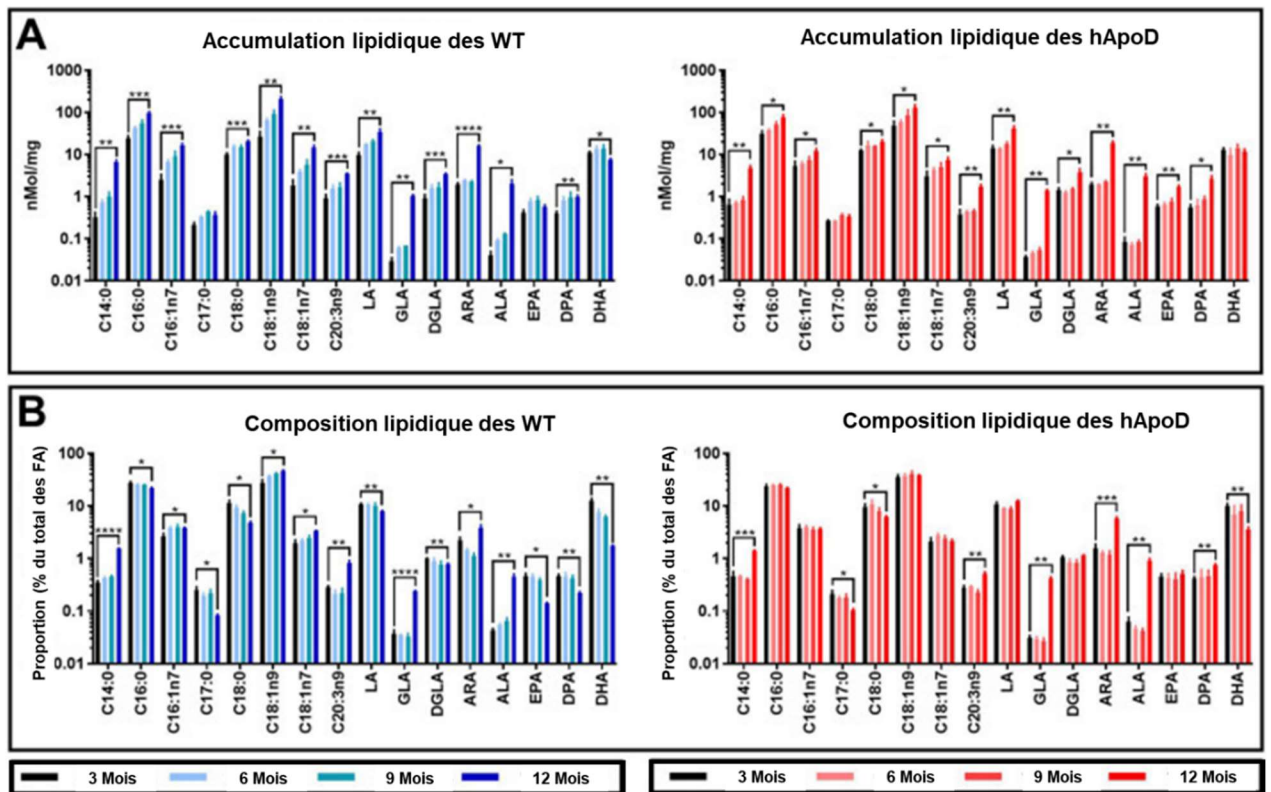
4

5

6

1

2 **Figure supp. 3.3**



3

4

5

CHAPITRE IV

L'APOLIPOPROTÉINE D CÉRÉBRALE S'ÉCHAPPE DU CERVEAU ET S'ACCUMULE DANS LES TISSUS PÉRIPHÉRIQUES

CEREBRAL APOLIPOPROTEIN D EXITS THE BRAIN AND ACCUMULATES IN PERIPHERAL TISSUES

Frederik Desmarais, Vincent Hervé, Karl-F. Bergeron, Gaetan Ravaut, Morgane Perrotte, Guillaume Fyfe-Desmarais, Eric Rassart, Charles Ramassamy, Catherine Mounier

International Journal of Molecular Sciences, 16 April 2021, 22(8), 4118

4.1 Avant-propos

Les recherches effectuées afin de compléter le chapitre III ont permis d'éclaircir comment la surexpression de l'ApoD affecte le métabolisme lipidique et inflammatoire hépatique. Il restait toutefois une question importante qui n'avait pas été adressée par ces recherches. Comment une surexpression neurale de l'ApoD pouvait-elle mener à un effet hépatique? Nous avons émis l'hypothèse que l'ApoD engendrait cet effet en augmentant le transport, ou la rétention, des acides gras omégas vers le foie. Toutefois, pour que l'ApoD puisse effectuer ces actions, elle devait donc se trouver physiquement dans la circulation et le foie des animaux. Or, le promoteur choisit pour surexprimer l'ApoD est celui du gène *Thy1* (*Cd90*) un gène principalement exprimé dans le cerveau. Le promoteur du gène *Thy1* est couramment utilisé afin d'exprimer des protéines fluorescentes dans les neurones des souris (Porrero, Rubio-Garrido, Avendano, & Clasca, 2010). L'ApoD ainsi produite dans les souris hApoD aurait donc dû se trouver dans le cerveau des animaux. Or, l'étude de Do Carmo *et al.* 2009, avait caractérisé l'expression de l'ApoD humaine chez ces souris. L'étude de l'expression en ARNm de l'ApoD humaine avait détecté une expression dans le foie par PCR semi-quantitative, mais non par « Northern Blot ». Cela indiquait donc que l'ApoD humaine serait produite à un niveau très faible dans le foie des animaux. En contrepartie, la protéine était, elle, clairement détectée dans le foie (Do Carmo, Fournier, et al., 2009). Cette donnée induisait donc un doute que l'ApoD hépatique était entièrement produite dans le foie et suggérait qu'une majeure partie de celle-ci provenait probablement du cerveau. Cependant, le système nerveux central (SNC) est isolé du reste de la circulation sanguine par de multiples barrières qui bloquent l'entrée et la sortie de la majeure partie des molécules et protéines circulantes. En plus de cette embuche, le liquide cébrospinal (CSF) et ses composantes est drainé et recyclé à l'aide d'un système complexe (B. L. Sun et al., 2018). Nous avons donc entrepris de déterminer si l'ApoD cérébrale avait effectivement la capacité de s'échapper efficacement du SNC pour

aboutir dans le foie et potentiellement dans d'autres tissus métaboliques. Autrement dit, nous avons tenté de déterminer si l'ApoD pourrait utiliser une voie de transport actif afin de quitter le SNC, plutôt que d'être simplement drainée passivement avec le CSF.

Nous avons injecté séparément de l'ApoD et de l'albumine radiomarquée dans des souris C57BL/6. L'albumine avait été choisie comme contrôle négatif, car toutes les études publiées à ce jour montrent que l'albumine ne traverse pas les barrières du SNC pour entrer ou quitter le cerveau via un mécanisme actif. Plutôt, la faible concentration d'albumine trouvée dans le CSF provient d'une diffusion passive entre les cellules formant la BBB. Cette albumine est éventuellement drainée dans le CSF pour être évacuée passivement. Nous avons procédé à la fois à des injections intra-cérébro-ventriculaires, ainsi qu'à des injections intravasculaires de ces protéines. Nous avons ensuite mesuré la radioactivité retrouvée dans les tissus et fluides des souris. Ces expériences ont permis de démontrer que, contrairement à l'albumine, l'ApoD s'échappe rapidement du cerveau. De plus, cette étude a permis d'établir la biodistribution de l'ApoD une fois sortie du cerveau. Ainsi, il a été établi que les cibles principales de celle-ci sont les reins et l'urine, ainsi que les muscles et le foie. L'ApoD pouvait également s'accumuler dans le pancréas, la rate, l'intestin et le tissu adipeux mésentérique, mais dans une moindre mesure. L'accumulation spécifique de l'ApoD (% de l'hApoD récupérée /g de tissu) variait de manière importante selon les tissus. Il a également été déterminé que la glycosylation de BSG, le récepteur membranaire de l'ApoD (Najyb et al., 2015), serait un facteur important déterminant l'affinité du tissu pour l'ApoD. Des expériences *in vitro* ont aussi été effectuées sur des monocouches de cellules endothéliales de barrière hématoencéphalique b.End3. Ces expériences ont confirmé que l'ApoD, de manière dose-dépendante, est effectivement capable de traverser les cellules endothéliales de la barrière hématoencéphalique.

Ces travaux ont fait l'objet d'une collaboration entre notre équipe de recherche et celle du Dr. Charles Ramassamy (INRS santé, Laval). L'article issu de ces travaux a donc deux premier auteurs, soit : moi-même (Frédéric Desmarais) et le doctorant Vincent Hervé de l'équipe du Dr. Ramassamy. J'ai personnellement été impliqué dans toutes les étapes de ces travaux. De la formulation des hypothèses de recherche, à l'élaboration des méthodes, à l'exécution des expériences, puis à l'analyse des données et à l'écriture de l'article. Chacune de ces étapes a été encadrée par ma directrice de recherche, Catherine Mounier, de mon codirecteur Éric Rassart et de notre agent de recherche Karl-F Bergeron, ainsi que de notre collaborateur le Dr. Ramassamy. La procédure d'injection intra-cérébro-ventriculaire, ainsi que les expériences *in vitro* ont été effectuées par Vincent Hervé. La radio-iodation des protéines, les procédures d'injection intravasculaire et de perfusion, ainsi que les mesures de la radioactivité et la mesure de l'expression de BSG par immunobuvardage de type « western » ont été effectué par moi-même (Frédéric Desmarais).

4.2 Résumé

L'apolipoprotéine D (ApoD) est une glycoprotéine soluble et sécrétée faisant partie de la famille des lipocalines. L'ApoD possède des fonctions dans la neuroprotection et le métabolisme des lipides. Chez les rongeurs, la majeure partie de l'expression a lieu dans le système nerveux central et est à peine produite dans les tissus métaboliques. Malgré cela, l'ApoD semble avoir un profond effet sur les tissus métaboliques périphériques. De plus, la surexpression neurale d'ApoD chez la souris induit le développement d'une stéatose hépatique non-inflammatoire. Le foie de ces souris est caractérisé par une importante accumulation d'acide arachidonique, le ligand préférentiel de l'ApoD, ainsi que de plusieurs autres acides gras polyinsaturés. Ces données indiquent que l'ApoD neurale pourrait atteindre et influencer le métabolisme des organes périphériques. Par conséquent, nous avons entrepris de déterminer, chez la souris, si l'ApoD cérébrale peut atteindre la circulation et s'accumuler dans les tissus périphériques. Nos résultats indiquent que 3 heures sont suffisantes pour que plus de 40% de toute l'ApoD humaine (hApoD) radiomarquée, injectée bilatéralement dans les ventricules cérébraux des souris, quitte le SNC. Une fois en circulation, l'hApoD tendait à s'accumuler principalement dans les reins/l'urine, dans le foie, et les muscles. L'hApoD s'accumulait également dans une moindre mesure dans d'autres tissus métaboliques tel que le pancréas, le caecum, la rate, et le tissu adipeux mésentérique. La spécificité d'accumulation de l'ApoD dans ces tissus était fortement corrélée avec le niveau d'expression de la forme sous-glycosylée de la basigine (BSG, CD147), le récepteur neuronal de l'ApoD. La capacité de l'hApoD à traverser les cellules endothéliales de barrière hématoencéphalique b.End3 a également été observée.

Toutefois, la présence de cyclophiline A lors les essais de compétitions pour l'internalisation dépendante de BSG dans les cellules b.End3 n'a pas eu d'effet. Cela indiquait que la sortie de l'ApoD du cerveau est soit indépendante de la BSG ou qu'elle dépend également de la présence d'autres types cellulaires ou encore d'autres récepteurs. En somme, nos données montrent que l'ApoD peut quitter rapidement et efficacement le SNC et atteindre les tissus périphériques. La nature des principaux réservoirs d'ApoD (foie, reins/urine) est liée au recyclage et à l'excrétion des lipides et toxines. Ceci indique que la surexpression cérébrale d'ApoD lors des épisodes neurodégénératifs pourrait servir à évacuer rapidement les ligands neurotoxiques de l'ApoD lors de ces mêmes épisodes.

Mots clefs

Apolipoprotéine D, Basigine, Accumulation protéique, Barrière hémato-encéphalique

4.3 Abstract

Apolipoprotein D (ApoD) is a secreted lipocalin associated with neuroprotection and lipid metabolism. In rodent, the bulk of its expression occurs in the central nervous system. Despite this, ApoD has profound effects in peripheral tissues, indicating that neural ApoD may reach peripheral organs. We endeavour to determine if cerebral ApoD can reach the circulation and accumulate in peripheral tissues. 3 hours was necessary for over 40% of all the radiolabeled human ApoD (hApoD), injected bilaterally, to exit the CNS. Once in circulation, hApoD accumulates mostly in the kidneys/urine, liver, and muscles. Accumulation specificity of hApoD in these tissues was strongly correlated with the expression of lowly glycosylated basigin (BSG, CD147). hApoD was observed to pass through bEnd.3 blood brain barrier endothelial cells monolayers. However, cyclophilin A did not impact hApoD internalisation rates in bEnd.3, indicating that ApoD exit from the brain is either independent of BSG or relies on additional cell types. Overall, our data shows that ApoD can quickly and efficiently exit the CNS and reach the liver and kidneys/urine, organs linked to the recycling and excretion of lipids and toxins. This indicates that cerebral overexpression during neurodegenerative episodes may serve to evacuate neurotoxic ApoD ligands from the CNS.

Keywords:

Apolipoprotein D, Basigin, Protein accumulation, Blood-brain barrier

4.4 Introduction

Apolipoprotein D (ApoD) is a 25-30 kDa glycosylated protein belonging to the lipocalin superfamily of hydrophobic molecule carriers (Balbin et al., 1990; Kielkopf et al., 2018; H. Li et al., 2016; Rassart et al., 2020). ApoD is known for its ability to bind various ligands, including arachidonic acid (ARA) and progesterone (Morais Cabral et al., 1995; Rassart et al., 2000; Rassart et al., 2020). ApoD can bind ARA and mediate its release from cell membranes. Furthermore, since ARA is the precursor of the eicosanoid class of lipid inflammation mediators, ApoD's capacity to bind ARA allows it to modulate the production of eicosanoids and attenuate inflammation (F. Desmarais, Bergeron, Rassart, & Mounier, 2019; Elizabeth A. Thomas et al., 2003). ApoD can also limit inflammation and oxidative stress by reducing oxidized lipids (Bhatia et al., 2013; Bhatia et al., 2012; Dassati et al., 2014; Ganfornina et al., 2008; Rassart et al., 2020). Because it is overexpressed during many neurodegenerative diseases and stresses, ApoD is considered an important actor in brain protection and repair (Dassati et al., 2014; Do Carmo et al., 2008; Ganfornina et al., 2008; Najyb et al., 2015; Najyb, Do Carmo, Alikashani, & Rassart, 2017). ApoD is also a member of the apolipoprotein family as it associates with lipoproteins (mainly high-density lipoproteins). In humans, contrary to most apolipoproteins, ApoD is minimally produced in the liver and intestines (Rassart et al., 2000; Rassart et al., 2020). Rather mRNA expression is found, although in varying quantities, in several tissues including the central nervous system (CNS), mammary glands, spleen, adipose tissues, adrenals and skin (D. Drayna et al., 1986; Garcia-Mateo et al., 2014; Rassart et al., 2020). In contrast to human, in mice and rats, ApoD mRNA expression is mainly restricted to the CNS (Cofer & Ross, 1996; Do Carmo, Fournier, et al., 2009; H. Li et al., 2016; Rassart et al., 2020; Séguin et al., 1995). However, moderate to high protein levels are found in peripheral tissues including the liver suggesting that the protein could cross

the blood brain barrier (BBB) (Boyles, Notterpek, Wardell, et al., 1990; Rassart et al., 2020).

In support to the hypothesis that apoD can exit the CNS, the overexpression of human ApoD (hApoD) in the CNS of transgenic mice leads to elevated level of apoD in the livers, likely originating from expression in the CNS (Do Carmo, Fournier, et al., 2009). These transgenic mice develop hepatic and muscular steatosis (F. Desmarais et al., 2019; Do Carmo, Fournier, et al., 2009; Labrie et al., 2015) probably because apoD modulates the metabolism of these tissues.

Beside its ability to circulate as part of lipoproteins, up to 10% of plasma ApoD is found in the protein phase, indicating that ApoD may also circulate freely in its soluble form (Camato et al., 1989). Three recent studies have also highlighted the presence of ApoD in extracellular vesicles (Cheow et al., 2016; Jiang et al., 2019; Pascua-Maestro et al., 2018). ApoD has been shown to be transported to neurons by extracellular vesicles originating from astrocytes (Pascua-Maestro et al., 2018). ApoD was also observed in urine (H. Sun et al., 2019). Together, the results show that ApoD transport is polyvalent and complex.

The Basigin (BSG) receptor, also known as cluster of differentiation 147 (CD147), mediates ApoD internalisation in neurons (Najyb et al., 2015). BSG is also responsible for the internalisation of other proteins such as caveolin with its affinity being dependent on BSG glycosylation level (W. Tang et al., 2004). BSG is expressed in a wide range of tissues and cell types (Uhlen et al., 2015a) (data available at <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000172270BSG/tissue>). Circulating ApoD, through BSG-mediated internalisation, could therefore accumulate in many different structures. BSG is expressed in mouse brain endothelial cells, the main component of the blood-brain barrier (BBB) (Zuchero et al., 2016). The BBB is the largest barrier

separating the peripheral circulation from the CNS (Pardridge, 2016). It is a highly selective barrier, composed of tightly linked endothelial cells that cover the bloodstream capillaries. Astrocytes and pericytes also participate in the architecture and function of the BBB. In addition to BSG, apolipoprotein receptors such as Low-density lipoprotein receptor (LDLR), LDLR-related protein (LRP1) and Megalin are also expressed in BBB endothelial cells and are involved in transporting ligands across the barrier (Wagner et al., 2012).

The mouse brain microvascular endothelial cell line bEnd.3 is the most characterized in terms of tight junction proteins (Eigenmann et al., 2013; Rahman et al., 2016) and is thus often used to study the endothelial component of the BBB (S. Yang et al., 2017). These cells express the tight junction proteins ZO-1, occludin and claudin-5 (Rabanel, Picc, Landri, Patten, & Ramassamy, 2020) and possess fluorescein permeability similar to those of primary mouse endothelial cells (T. Watanabe et al., 2013). These mouse brain capillary endothelial cells contains several receptors present on the surface of endogenous BBB endothelial cells, including apolipoprotein receptors such as LDLR and LRP1. These cells also possess receptors that participate in the transcytosis process of proteins such as transferrin and lactoferrin (Wagner et al., 2012).

In this study, we endeavour to determine if cerebral ApoD can reach the bloodstream from the brain and if BSG plays a role in this process. We also set out to determine in which peripheral organs ApoD preferentially accumulates once in circulation.

4.5 Material and methods

4.5.1 Animals

Experiments were carried out on C57BL/6 male mice of 3 to 4 months of age. Animals were housed under standard conditions at constant temperature (20-22°C) and humidity (50-60%), under a 12h light/dark cycle with free access to water and food (standard rodent chow; Charles River #5075). Experimental procedures were approved by the Animal Care and Use Committee of Université du Québec à Montréal (protocol #913).

4.5.2 Protein radiolabeling

Human ApoD (hApoD), purified from breast cyst fluid (Balbin et al., 1990) and bovine serum albumin (BSA) were both radiolabelled with iodine-125 in the form of iodine monochloride following the method described by A.S. McFarlane (McFarlane, 1958). Unbound Iodine-125 was removed by exclusion chromatography using Bio-Spin 6 gel columns (BioRad #732-6002). The eluted protein concentration was assessed by Bradford assay (Bradford 1976). Specific radioactivity ranged from 0.11 to 0.16 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ of protein. Radiolabeled proteins were visualised after denaturing gel electrophoresis followed by revelation using a Molecular Dynamics Storage Phosphor Screen (Kodak Storage Phosphor Screen SO230) and Typhoon FLA9500 (**Supp. Fig.4.1**).

4.5.3 Intracerebroventricular and intravascular injections

For intracerebroventricular (ICV) injection, ketamine/xylazine anesthetized animals were placed on a stereotaxic table (Stoelting #51600). Approximately 2.5 μg of radiolabeled hApoD or BSA (5 μl volume; 7×10^5 CPM) was bilaterally injected into

the lateral ventricles at a rate of 0.2 $\mu\text{L}/\text{min}$ (Hamilton syringe 1701 N) as described in the literature (Sasaki-Hamada, Ikeda, & Oka, 2019; Xiang et al., 2019). The bregma coordinates used for injection were: 1.0 mm lateral, -0.3 mm posterior and -2.5 mm below, as previously described (Y. Chen et al., 2014). The needle was gently removed 5 minutes after the end of each injection. For intravascular injections, 100 μL PBS (pH 7.4) containing 3×10^6 CPM (1.35 μCi) of either radiolabeled hApoD or BSA was administered via the tail vein (26G syringe).

4.5.4 Tissue and fluids sample preparation

To collect urine, the bladder was emptied with a 26G needle and syringe. Blood was collected by cardiac exsanguination from the left ventricle with a 22G needle and syringe without damaging the inferior vena cava. Immediately after, the blood was flushed from the circulation by performing a whole-body perfusion. Briefly, a catheter was inserted into the inferior vena cava from the right auricle of the heart and maintained in place with surgical sutures. The lower part of the right ventricle was perforated to allow the blood to escape. A buffer solution (128mM NaCl, 4.0mM KCl, 0.62mM H_2PO_4 , 1.1mM NaH_2PO_4 , 11.1mM Dextrose, 10.1mM HEPES, 1.1mM MgCl_2 , 0.42mM MgSO_4 , 1.5mM CaCl_2 , pH 7.4, 37°C) was then circulated with a peristaltic pump at 2 mL/min for at least 5 minutes, until the buffer-diluted blood coming out was clear. Organs and tissues were then collected: brain, liver, adductor and medial hamstring muscles, kidneys, heart, spleen, pancreas, caecum, bone marrow, as well as omental, mesenteric and subcutaneous adipose tissues.

Plasma was prepared by centrifugation (15 minutes; 2,000 g) of 500 μL blood mixed with 50 μL EDTA 10%. Whole organ weight was determined whenever possible (for brain, liver, kidneys, heart, spleen, pancreas and caecum). Because only samples of

adipose tissues and bone marrow were obtained, their whole organ weight was not determined. Tissue samples were homogenised in a lysis buffer (2µL/mg of tissue) suitable for tissues with high a lipid content (50mM Tris-HCl pH 7.4, sucrose 250mM, 100mM NaF, 10mM sodium pyrophosphate, 1mM EDTA, 1mM DTT, 1mM sodium vanadate, 1mM PMSF) using a Dounce tissue grinder (Wheaton, 357421). Tissue homogenate and fluid (plasma and urine) radioactivity was measured by scintillation counting. Individual organ radioactivity was extrapolated by multiplying the specific radioactivity (CPM/g of tissue sample) by the weight of the organ. To extrapolate blood radioactivity, plasma was considered to account for 58% of the blood volume (Feher 2012) and the total blood volume was considered to be 2mL for a 25g mouse (Harkness & Wagner, 1989). Pelleted blood cells had radioactive levels approximately half of that of the plasma itself according to Geiger counter readings. Therefore, blood cell specific radioactivity (BCSR) was estimated from the plasma specific radioactivity according to the following equation:

$$BCSR = \frac{\text{Plasma specific radioactivity}}{2}$$

Total blood radioactivity (TBR) was calculated as follows:

$$TBR = ((\text{Plasma specific radioactivity} \times 0.58) + (BCSR \times 0.42)) \times \frac{2ml}{25g} \times \text{Body weight}$$

Similarly, whole muscle radioactivity was extrapolated from the combined adductor and medial hamstring muscles specific radioactivity and the animal body weight. Total wet skeletal muscle mass was considered to be 6.9g for a 25g mice, consisting of 1.8g of dry weight (Griffin & Goldspink, 1973) and 5.1g of water (water composition of 75%) (B. Yang et al., 2000). Total muscle radioactivity was calculated as follows:

$$\text{Total muscle radioactivity} = \text{Muscle specific radioactivity} \times \frac{6.9g}{25g} \times \text{body weight}$$

In addition to measuring radioactivity from the urine contained in the bladder, the bottom of each cage was swabbed with a humid absorbing paper and this radioactivity (measured by scintillation counting) was added to the urine fraction. The total recovered radioactivity was determined by adding all tissues and fluids together.

4.5.5 Cell culture

The bEnd.3 brain endothelial cell line was obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, CRL-2299). Cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), with 10 % fetal bovine serum (FBS), 1% sodium pyruvate (1 mM) and antibiotics (100 U/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin) from Wisent Bioproducts, in a humidified incubator at 37°C with 5% CO₂.

To generate monolayers, 30,000 bEnd.3 cells were seeded on the upper surface of Falcon cell culture inserts (Corning, #08770) placed within the wells of a 24-well plate (Corning, #09761146). The culture medium (apical and basal sides) was replaced every two days. After 7-10 days, monolayer imperviousness was systematically validated via transendothelial electrical resistance (TEER) (Supp. Fig.2) measurements using a voltage and resistance meter (EVOM2, World Precision Instruments Inc.) equipped with a cell culture cup chamber electrode (Endohm-6, World Precision Instruments Inc. USA). The background value measured on a cell-free insert (insert resistance) was subtracted from the each raw TEER measurement. Resistivity (Ohms.cm²) was calculated as follows:

$$\text{TEER} = (\text{Resistance } (\Omega) - \text{Insert Resistance } (\Omega)) \times \text{Surface area (cm}^2\text{)}$$

Monolayers with TEER values of at least 35 Ohms/cm² (Supp. Fig.2) were retained for transcytosis experiments (Wuest, Wing, and Lee 2013; Clark and Davis 2015).

The monolayers were also systematically validated by assessing permeability to Dextran-FITC (10kD, Sigma-Aldrich). Briefly, 10µl of Dextran-FITC (1mg/mL; in serum-free, phenol red-free culture media) were added to the media on the apical side of the insert. After a 1h incubation, 150µl of culture medium was sampled from the basal compartment and analyzed on a 96-well plate reader (Tecan, Switzerland). Apparent permeability index (P_{app}) was calculated from the following equation:

$$P_{app} = \frac{V_R \Delta C_R}{\Delta t S_{ins} C_D}$$

With P_{app} apparent permeability (cm.s⁻¹); V_R, volume of receiving compartment (cm³), ΔC_R, change in concentration in the receiving compartment (µM); Δt, time in seconds (s); S_{ins}: surface of the insert (cm²) and C_D: concentration in the donor compartment (µM) (S. Yang et al., 2017). Monolayers with Dextran-FITC apparent permeability values (P_{app}) below 10⁻⁶ cm.s⁻¹ were used for transcytosis experiments (G. Li et al., 2010). Monolayers were further validated following transcytosis experiments by verifying the presence of Claudin 5-positive tight junctions between cells (S. Yang et al., 2017).

For our transwell assays, monolayer cells were treated 24h on the apical side with hApoD (purified from human cystic fluid) at 200 or 400 ng/ml with or without recombinant human cyclophilin A (R&D systems, 3589-CAB). Cell viability (**Supp. Fig. 4.2**) was confirmed using a resazurin-based kit (Sigma-Aldrich, TOX8).

4.5.6 Immunofluorescence

Monolayer cells were fixed with 4% paraformaldehyde 15 minutes at room temperature, permeabilized with 0.2% Triton X-100 in PBS and blocked with 5% no-fat dry milk in PBS. Primary antibodies rabbit anti-Claudin 5 (Thermofisher #34-1600) and mouse anti-ApoD (2b9 1:100) (Terrisse et al., 2001) were used with the dilution (1:100). Secondary antibodies rabbit Alexa Fluor 488 (Invitrogen #A11008) and mouse Alexa Fluor 594 (Invitrogen #A11005) were used with the dilution 1:500. The nuclei were stained with Hoechst 33258 (10 μ g/ml, Sigma-Aldrich #861405) 15 minutes at room temperature. Then, inserts were placed on a slide with mounting medium (ProlongTM Gold Antifade Mountant). Mounted inserts were examined on a Zeiss LSM780 system confocal microscope equipped with a 30mW 405 nm diode laser, a 25mW 458/488/514 argon multiline laser, a 20mW DPSS 561 nm laser and a 5mW HeNe 633 nm laser mounted on Zeiss Axio Observer Z1, as well as a Plan-Apochromat 63x oil DIC 1.4NA objective. Images (1.6x zoom scans) were acquired with Zen 2011 software (Zeiss, Germany). Images were analyzed with ImageJ software (version 1.52p).

4.5.7 Immunoblotting

For tissue sample analysis, lysates were incubated 30 minutes at 4oC, cleared by centrifugation (10,000 g, 15 minutes) and the lipid layer was discarded. For bEnd.3 transwell media analysis, media proteins from apical and basal sides were concentrated with Amicon Ultra-0.5 10kDa centrifugal filters (Millipore Sigma #UFC501024).

For both sample types, protein concentration was assessed by Bradford assay (Bradford 1976). Proteins (20 μ g, unless otherwise indicated) were separated on 10% SDS-PAGE gels and transferred on PVDF membranes. Blocking was performed using 5% milk, 1h at room temperature. Membranes were then incubated with primary antibodies overnight at 4oC. Antibodies used were against Basigin (Abcam, ab188190 1:5,000), ApoD (MyBioSource #2003092 1:1,000), and goat anti-rabbit HRP conjugated IgG

(Sigma-Aldrich #A6154 1:10,000 or Abcam ab6721 1:4,000). Bands were visualized using chemiluminescent HRP substrate (Millipore, WBKLS0500) in a FUSION FX7 Imaging system and analyzed with the gel analyzer function of Image J software.

4.5.8 Statistics

Results are presented as mean \pm standard error of the mean. Statistical analysis was performed with GraphPad 7 software. For histograms, statistically significant differences from control values were determined by a one-tailed Student's t-test. A Welch's correction was applied when variances between groups were unequal (as determined by Fisher's f-test). Associations between variables of interest were quantified by linear regression analysis using Pearson's product moment correlation coefficients. Statistical significance was considered reached if p-value <0.05 or less.

4.6 Results

4.6.1 hApoD exits the central nervous system and reaches peripheral tissues

We endeavored to establish whether hApoD can exit the brain and reach the bloodstream and accumulate in peripheral organs. For this, the cerebral ventricles of mice were injected with radiolabelled hApoD or albumin as a control. Injected proteins were allowed to diffuse from the ventricles and tissue/fluid for 3 or 6 hours. Samples were subsequently taken throughout the mouse body. During this procedure, mice were perfused with a saline solution to avoid contamination in tissues stemming from potential radiolabelled proteins in the blood. Also, BBB integrity was confirmed by circulating an Evans blue solution in perfused mice (**Supp. Fig. 4.3**). As expected, 3

hours after ICV injection of radiolabeled proteins, most of the recovered albumin (93%; **Fig. 4.1A**), remained sequestered in the brain. Within this time frame, 41% of the recovered hApoD was found in the periphery, showing that hApoD can exit the brain compartment. Interestingly, a significant proportion of hApoD accumulated in the liver (6.06%) but the major fraction was found in urine (28.87%). Radioactivity levels in the bloodstream were very low, indicating that hApoD was rapidly cleared from the circulation. Electrophoresis of urine and brain protein samples in denaturing conditions confirmed that the radiation detected corresponded to native hApoD molecules migrating at 30 kDa (**Fig. 4.1B**).

4.6.2 hApoD accumulates in specific tissues

ICV injections were limited to a total volume of 10 μL (5 μL per ventricle), adding up to approximately 2.5 μg of radiolabeled proteins. Under these experimental restrictions, hApoD could only be shown to accumulate in the kidneys and liver (**Fig. 4.1A**). The radiation found in other organs (muscles, pancreas, spleen, intestines, and others) was too close to background radiation levels to confidently affirm that hApoD had accumulated in these organs. To determine if hApoD can target other tissues, we injected a greater amount of radiolabeled protein (approximately 10 μg) directly in the bloodstream. Note that this higher dose of hApoD was still within physiological parameters for circulating ApoD (Rassart et al. 2000). Albumin was again chosen as a control because of its propensity to remain in the circulation (Andersen et al., 2014). Again, the blood and its radioactive content were eliminated by perfusion with a saline solution before tissue samples were taken. The amount of recovered radiolabeled hApoD was evaluated 3h and 6h post-injection (**Fig. 4.2A**) and as a function of the albumin control (**Fig. 4.2B**). Accumulation of hApoD occurred at a higher rate than albumin in the kidneys (5.6-fold), liver (30.0-fold), pancreas (3.1-fold), caecum (2.8-

fold), spleen (3.3-fold), mesenteric adipose tissue (MAT; 4.2-fold) and muscles (2.4-fold) at least at either 3 or 6 hours. The kidneys emerged as the tissue that most readily accumulates hApoD with 14% of recovered radioactivity per gram of tissue. This accumulation was probably due to hApoD within the nephrons since a major part of the radioactivity was found in urine (**Fig. 4.3A**). The biggest difference between albumin and hApoD accumulation however was found in the liver (**Fig. 4.2B**), indicating a very strong specificity of hApoD for this tissue. Interestingly, the accumulation of hApoD in muscles was stronger than albumin 3h after injection. However, after 6h, hApoD levels diminished (from 1.6 to 1.0% per gram of tissue) while albumin levels increased (from 0.7 to 1.4% per gram of tissue). Conversely, hApoD accumulation in the MAT appeared to be more persistent than albumin. MAT radiation from hApoD only diminished by 0.10% per gram of tissue in 3h. In comparison, radiation from albumin was reduced by 0.96% per gram of tissue in that same interval. Very interestingly, hApoD within the bloodstream did not appear to enter the brain suggesting that hApoD can only cross the BBB in one direction.

To establish a general portrait of hApoD biodistribution when it exits the bloodstream, we extrapolated the total radioactivity found in each organ (or fluid) according to their total weight (or volume). Since we did not measure the total weight of adipose tissues nor of bone marrow, these tissues were excluded from this analysis. Albumin was mainly found in circulation at both 3h (91%) and 6h (83%) after injection (**Fig. 4.3A**). As expected from our previous results, hApoD exited the bloodstream at a higher rate than albumin. After 6 hours, half of the injected hApoD had left the circulation and a significant fraction was again found in urine (33%; **Fig. 4.3A**). Globally, hApoD accumulation level in tissues was higher at 3h (25.2%) compared to 6h (18.1%), suggesting a progressive shift of hApoD from blood to tissues and finally to urine. The principal target of hApoD at 3h (**Fig. 4.3B**) was the muscles (10.67%) followed by the liver (8.93%), kidneys (3.09%), pancreas (1.24%) and spleen (0.41%). Because of their

mass, muscles accounted for a large proportion of hApoD accumulation despite their poor apparent affinity for hApoD (Fig 2). For instance, while the liver accumulated hApoD at a much higher rate (6.0 % of recovered radioactivity per gram of tissue), it was still outclassed in total hApoD accumulation by the muscles despite their low accumulation rate (1.6 % of recovered radioactivity per gram of tissue; see **Fig. 4.2A**).

4.6.3 hApoD transcytoses through bEnd.3 brain endothelial barrier cells

Since hApoD can exit the brain compartment, we explored the possibility that hApoD might be able to pass through a BBB model consisting of a monolayer of the endothelial bEnd.3 cells. The impermeability of this monolayer model to passive diffusion was validated by electrical resistance measurement (≥ 35 Ohms/cm²) and Dextran permeability assay (**Supp. Fig. 4.2**). Expression of Claudin-5 between adjacent cells was also validated, confirming the formation of tight junctions (**Fig. 4.4A**). Within 24h, exogenous hApoD applied to the apical side of the monolayer was internalized (**Fig. 4.4A**) and was found in the basal medium (**Fig. 4.4B**), indicating that hApoD is subject to transcytosis through bEnd.3 cells in a dose-dependent manner. However, bEnd.3 cells are not polarized (Brown, Morris, & O'Neil, 2007; Helms et al., 2016). Therefore, our results may underestimate the amount of hApoD that actually underwent transcytosis since part of the internalized protein could be released back to the apical side where it was first internalised and not contribute to the buildup of ApoD concentration in the basal side.

4.6.4 Cyclophilin A competition does not reduce hApoD internalisation in brain endothelial barrier cells

Having confirmed that hApoD can cross through bEnd.3 brain endothelial cells, we next endeavoured to determine if the BSG receptor was implicated in this process. We

used cyclophilin A, a BSG ligand known to compete with ApoD for BSG-dependent internalization (Najyb et al., 2015). We first confirmed that cyclophilin A was non-toxic at the concentrations used (**Fig. 4.5A**). Surprisingly, internalization and transytosis of hApoD by bEnd.3 monolayers were unchanged despite the presence of various molar ratios of competing cyclophilin A (up to 10-fold excess relative to hApoD; **Fig. 4.5B-D**). We then determined if BSG was expressed in bEnd.3 cells in comparison to control tissues (brain and liver). Our analysis shows that BSG was expressed in bEnd.3 cells at a comparable level to the liver, the tissue with the highest specific affinity for hApoD. Interestingly, BSG expression was much stronger in bEnd.3 than in whole brain lysate. Additionally, the level of BSG glycosylation varied greatly between samples (**Fig. 4.5E**). BSG glycosylation can influence its protein-protein interactions (W. Tang et al., 2004). Interestingly, the ratio of lowly-glycosylated BSG relative to total BSG expression appeared to align with our observed cellular affinity for hApoD internalization in vivo (**Figs. 4.5F and 4.2A**). The liver, one of the tissues that most readily accumulate hApoD, had a high LG-BSG /total ratio, while the bEnd.3 cells had a lower ratio and needed 24 hours to internalise and excrete hApoD to the basal media. This suggested a greater role of BSG in peripheral tissues than in endothelial cells for hApoD internalization.

4.6.5 Relationship between BSG glycosylation and hApoD accumulation

To further explore if BSG glycosylation was linked to the degree of tissue hApoD internalization, we studied the expression of the multiple glycosylated forms of BSG in mice tissues. BSG expression, per mg of tissue, was heterogeneous between tissues, with the liver and heart presenting an especially high overall BSG expression and adipose tissues having a low expression (**Fig. 4.6A**). BSG bands were observed at multiple size and in varying patterns according to the tissue type. The SAT, muscles

and the brain only expressed the highly-glycosylated form of BSG (FG-BSG, >48kDa). The liver and pancreas, however, expressed multiple forms of BSG (**Fig. 4.6A**). We next performed correlations between BSG expression by glycosylation levels and the specific accumulation of hApoD in each tissue. As expected, the total expression of BSG in tissues was positively correlated with hApoD accumulation. However, the correlation was only statistically significant for the 3-hour time point (**Fig. 4.6B**). Interestingly, expression of the highly glycosylated form of the BSG was not found to be associated with hApoD specific accumulation. In opposition, LG-BSG expression was correlated with hApoD specific accumulation at both time points, but especially 6 hours after injection ($p=0.0047^{**}$). Kidneys were outliers relative to all other tissues investigated and were therefore excluded from these correlation analyses (presented as separate data set)(**Fig. 4.6B**). It is very likely that hApoD does not require to be internalized in kidney cells during urine excretion and it is probably passively filtered through the glomerular pores (discussed later).

4.7 Discussion

Our results demonstrate that injected hApoD can exit the brain and reach metabolic tissues. These observations were made by comparing the amount of hApoD that escaped the CNS to an albumin control. The rate at which hApoD leaves the brain was observed to be higher than that of albumin. Albumin is a natural component of the cerebro-spinal fluid (CSF). Its concentration in the CSF is lower than 1/125th of the one found in circulation (CSF/serum ratio $< 8 \times 10^{-3}$) (Tumani, Huss, & Bachhuber, 2017) and the CNS barriers greatly limit albumin's ability to transfer bilaterally between the brain and the circulation. Similarly to other components of the CSF, albumin is constantly eliminated from the brain by the brain's waste clearance system

(Jessen, Munk, Lundgaard, & Nedergaard, 2015; Tumani et al., 2017). The elimination of albumin from the CNS is a passive process that does not require an active transport across CNS barrier. In contrast, the hApoD's higher exit rate strongly suggest that it might be actively transported.

The two major circulating hApoD recipient organs are the kidneys/urine and the liver, both major organs implicated in waste recycling and removal. This corroborated our previous hypothesis that cerebral hApoD reaches the liver (F. Desmarais et al., 2019). We previously showed that hApoD overexpression in the brain results in the development of an hepatic and muscular steatosis in mice (Do Carmo, Fournier, et al., 2009). The presence of hApoD as well as an increase in ARA proportion in the liver suggested that hApoD derived from the brain was responsible for the added efflux of ARA into the liver (F. Desmarais et al., 2019; Do Carmo, Fournier, et al., 2009; Labrie et al., 2015).

Surprisingly, a large part of the hApoD recovered outside the CNS was found in the urine. It was previously shown that ApoD can pass through the kidneys and accumulate in urine in monomeric and dimeric form (Blanco-Vaca & Pownall, 1993). Multiple factors including protein size and charge determine which molecules can pass through the kidneys by glomerular filtration. It is generally believed that proteins and polymers in the range of 30-50kDa can pass through the glomerular pores. However, the diameter and shape of the molecules are also important as elongated molecules such as 350-500 kDa nanotubes with 1 nm diameter have been shown to be efficiently cleared by glomerular filtration (Ruggiero et al., 2010). Glomerular pores have been described as cuboids with an average dimension of 4 nm (40 Å) by 14 nm (140 Å) in a cross section, and 7nm (70 Å) in length (Rodewald & Karnovsky, 1974). Albumin is a 66-69 kDa flexible, ellipsoid-shaped protein with a 3.8 nm diameter and a length of 15 nm. Despite its size, approximately 3.3g of albumin is filtered daily in the human kidney (Tojo &

Kinugasa, 2012). Therefore, it was not surprising to find albumin in urine. ApoD is a 29-32 kDa, 4.5 nm (45 Å) by 4.0 nm (45 Å) protein (Eichinger et al., 2007). Considering its size, it is likely that hApoD is also able to directly pass through the glomerular pores and end up in urine without the assistance of active transport. This idea is supported by the fact that kidneys were outliers in our correlation between BSG expression and hApoD accumulation in tissues (**Fig. 4.6B**). This indicated that BSG was likely not implicated in this process or that another mechanism was far more important for hApoD accumulation in kidney\urine. However, the physiological relevance ApoD's capacity to be filtered by the kidneys remain elusive.

One possible interpretation is that ApoD could participate in waste elimination from the CNS or other targeted tissues. ApoD is overexpressed in periods of neurodegenerative stress (Bhatia, Kim, Shepherd, & Halliday, 2019; Desai et al., 2005; Kalman et al., 2000; Najyb et al., 2017; Ong, Hu, & Patel, 2002; Terrisse et al., 1998; E. A. Thomas et al., 2001). ApoD is known to facilitate myelin clearance, extracellular matrix remodeling and axon regeneration after nerve injury (Garcia-Mateo et al., 2014). A large quantity of hydrophobic and pro-inflammatory molecules is released from damaged neurones and myelin sheets after nerve injury. ARA and lysophospholipids (LPC) are two of the major products resulting from PLA2-mediated myelin cleavage and are both ApoD ligands. In fact, ApoD-null mice have higher basal levels of free ARA and LPC in intact nerves as well as a lower free LPC level than wildtype mice in injured nerves (Garcia-Mateo et al., 2014). The lack of ApoD during nerve injury appears to cause a heightened inflammatory response, delayed inflammation resorption and slower healing process (Garcia-Mateo et al., 2014). It is believed that this occurs, at least in part, because of a lack of proper management and clearance of free ARA and LPC. Considering our present results, it is possible that ApoD might redirect part of the released lipids away from the neurones and into the kidneys and liver during these episodes. This may prevent further damage caused by peroxidized lipids or pro-

inflammatory ARA-derived eicosanoids in the brain (Bazinet & Laye, 2014; Garcia-Mateo et al., 2014).

Our results also show that hApoD is rapidly depleted from the circulation in favor of tissular accumulation or excretion via the kidneys/urine. Interestingly, while ApoD is known to be increased in the CSF of patients with Alzheimer's disease (Terrisse et al., 1998), its plasmatic levels do not appear to be affected (Perrotte et al., 2019). This could be due to the quick pace at which hApoD is depleted from plasma. Unfortunately, no data exist on ApoD concentration in the urine and peripheral tissues from Alzheimer and other neurodegenerative diseases patients.

The skeletal muscles were also an important reservoir of hApoD accumulation, despite their poor specific affinity for hApoD (**Fig. 4.3A**) and low expression of the highly glycosylated BSG (**Fig. 4.6A**). They only remained an important hApoD reservoir because of their large mass. Additionally, accumulation of hApoD over albumin was only significant 3h post-injection and tended to be lower than albumin at 6h post-injection. It is worth mentioning that, while albumin largely stays in circulation, it can also accumulate in muscles (P. C. Smith, Frank, Kasdon, Dearborn, & Skillman, 1978) and intestinal cells (Hashem, Swedrowska, & Vllasaliu, 2018). This could explain why hApoD accumulation was stronger than albumin in these tissues at only one time point. Another evidence that ApoD targets the skeletal muscles is that transgenic mice overexpressing hApoD in their CNS develop muscle steatosis (Do Carmo, Fournier, et al., 2009). As of now, the literature provides little insight into ApoD's potential role in skeletal muscles. One study reported that ApoD, followed by the leptin receptor (LEPR), are the two most upregulated transcripts in muscle disuse atrophy. Meanwhile, genes responsible for energy metabolism, mitochondrial function, cell cycle regulation, stress response, sarcomere structure, cell growth/death, and protein turnover were downregulated (Y. W. Chen et al., 2007). ApoD is also upregulated in age-related

skeletal muscle cells senescence, where it is expected to play anti-oxidative and anti-inflammatory roles (Do Carmo et al., 2002; Ganfornina et al., 2008; Rassart et al., 2020). Our results indicate that circulating ApoD could also be implicated in these mechanisms.

The spleen also appears to be targeted by circulating hApoD. The spleen is the major site of heme recycling from senescent red blood cells. There, heme is converted to bilirubin and then transported to the liver to be secreted into bile in the intestines (Nowell, Leakey, Warren, Lang, & Frame, 1998). Interestingly, ApoD can bind to bilirubin (Peitsch & Boguski, 1990) and has long been suspected to participate in heme recycling (Rassart et al., 2000).

hApoD appeared to also have affinity for the MAT. We previously showed that ApoD protein levels in adipose tissue are linked to improved metabolic parameters in obese women. Specifically, protein levels of ApoD in the human MAT were associated with reduced circulating TNF- α and improved insulin sensitivity (QUICKY index). These correlations did not exist with ApoD mRNA expression (F. Desmarais et al., 2018) suggesting that circulating ApoD, after adipose tissue internalization, was specifically responsible for this association. This hypothesis is reinforced by our present results, which indicate that circulating hApoD can accumulate in the MAT. However, the role of exogenous ApoD in adipose tissues remains unclear. In this tissue, ApoD may exert anti-inflammatory effects through its ability to modulate ARA metabolism (F. Desmarais et al., 2019; Labrie et al., 2015; Elizabeth A. Thomas et al., 2003), to reduce oxidative stress (Bajo-Graneras, Ganfornina, Martin-Tejedor, & Sanchez, 2011; Bhatia et al., 2012; Charron, Ouellet, Houde, & Sarhan, 2008; Ganfornina et al., 2008; Muffat, Walker, & Benzer, 2008) and to disrupt osteopontin function, a protein implicated in macrophage recruitment (Jin et al., 2006; Rassart et al., 2020).

We used an *in vitro* model of the endothelial part of the BBB, bEnd.3 cell monolayers, to confirm that hApoD can be subject to internalization and transcytosis. Beside the BBB, there are also other barriers between the periphery and the CNS through which ApoD could cross. The blood-CSF barrier (BCSFB), for instance, separates the blood from the CSF. It is formed by epithelial cells and the tight junctions of the choroid plexus. ApoD could potentially cross this barrier, enter the bloodstream and then be distributed to peripheral organs. However, the BBB area in the human brain is 10 times greater than the BCSFB area (Takeshita & Ransohoff, 2012). Furthermore, since ApoD is mainly secreted by glial cells (Rassart et al., 2020), in proximity to the BBB, its preferred exit route is likely to be the BBB. This motivated the use of the bEnd.3 cell line as our *in vitro* model.

Considering that ApoD internalization is a BSG-dependent, cyclophilin A-sensitive mechanism in neurons and HEK 293T (Najyb et al., 2015), we expected BSG to be implicated in hApoD internalization by bEnd.3 cells. Though BSG is expressed by bEnd.3 cells, cyclophilin A did not limit hApoD internalization/transcytosis in our hands. Interestingly, the BSG glycosylation pattern in bEnd.3 cells is different from the one reported in 293T cells. The 293T cells appear to possess a greater amount of LG-BSG (especially 30-35 kDa). Furthermore, hApoD internalization by 293T cells was reported as soon as 4h after administration (Najyb et al., 2015), while that process necessitated 24h to be detectable in our bEnd.3 cell assays (data not shown). Our *in vivo* data shows that HG-BSG expression is not correlated to hApoD internalization in tissues, contrary to the LG-glycosylated forms. Higher levels of glycosylation present on a protein can hinder its protein-protein interactions (Arey, 2012). In agreement with this observation, deglycosylation of BSG was reported to increase its interaction with Caveolin-1 (W. Tang et al., 2004). It is likely that a similar phenomenon occurs between BSG and ApoD. This is supported by the fact that underglycosylated BSG expression is strongly associated with hApoD specific accumulation in peripheral

tissues (**Fig. 4.6B**). Taken together, these results suggest that, while BSG may be an important factor in peripheral hApoD cellular internalization, it may not be implicated in hApoD's capacity to exit the brain.

These results may also imply that BSG is not the exclusive receptor for ApoD. Inhibiting LDLR has previously been shown to reverse the synaptogenic effects of ApoD in dorsal root ganglion cell cultures (Kosacka et al., 2009). LDLR is present at the BBB as well as in bEnd.3 cells (Wagner et al., 2012) and is a major ApoE receptor in the brain (Bell et al., 2007; Deane et al., 2008). LDLR could therefore also participate in the passage of the ApoD through the BBB. The lack of competition by cyclophilin A could be due to an LDLR-mediated internalization of hApoD instead of a BSG-mediated one in bEnd.3 endothelial cells.

While we showed the passage of hApoD through endothelial cell monolayers, our model lacked the full complexity of the BBB. Though endothelial cells are the main components of the BBB, the mechanisms regulating the crossing of proteins through the BBB are more complex and involve other cell types. The BBB is also composed of pericytes and astrocytes in an architecture that is difficult to achieve *in vitro*. In fact, addition of glial cells to bEnd.3 cells in a co-culture model enhances the barrier function of the endothelial monolayer (S. Yang et al., 2017). To note, the presence of hApoD in the plasma was rapidly detectable *in vivo* (3 hours), a kinetic that was not replicable in our *in vitro* model. It appears highly probable that other cell types are implicated in hApoD exit from the brain.

In our experiments, we used free soluble hApoD monomer purified from cystic fluid. However, in physiological conditions, it is not excluded that ApoD may be able to pass through the BBB via extracellular vesicles (EVs). Indeed, ApoD is found in EVs (Cheow et al., 2016; Jiang et al., 2019; Pascua-Maestro et al., 2018), including EVs

from serum and CSF (Cheow et al., 2016). Recently, EVs secreted from astrocytes and containing ApoD were shown to be internalized in neurons and to contribute to the survival of neurons under oxidative stress (Pascua-Maestro et al., 2018). The passage of EVs from the periphery to the CNS has also been shown, notably in a drug delivery context where EVs were shown to cross the BBB in both directions (Alvarez-Erviti et al., 2011). Therefore, the high rate at which hApoD was able to exit the brain in vivo may be due to an inclusion on ApoD into EVs by glial cells prior to its passage through the BBB. This could also be a factor explaining the slow rate of internalization observed in vitro in endothelial bEnd.3 cells, where glial cells were absent.

In our study, circulating hApoD did not appear to enter the brain from the circulation. This could indicate that hApoD transport through the CNS barriers is unidirectional or simply follows its concentration gradient (from brain to blood) under normal conditions. It is also possible that the quick pace at which hApoD is internalized by other tissues depletes the circulating stocks of hApoD in a manner that prevents its return to the brain. It is worth mentioning that our data do not definitely prove that ApoD is incapable of entering the brain from the circulation. Our study was aimed at characterizing the biodistribution of hApoD upon release from the brain. Injected radiolabeled proteins that do enter the brain often do so at a low percentage (e.g. approximately 1% of the total injected amount for transferrin) (Vavere & Welch, 2005). Therefore, studies centered on the brain often employ methodologies different that used here. These include the use of a positive control and the injection of proteins into the left jugular vein instead of the tail vein (Banks, Farr, & Morley, 2000), with a possible recirculation of radiolabelled proteins (Fishman, Rubin, Handrahan, Connor, & Fine, 1987). Further steps will be required to formally ascertain if ApoD can enter the brain from the circulation. ApoD exist in different forms. Much like BSG, ApoD also posses multiple glycosylation levels which are likely to influence its protein-protein interactions (H. Li et al., 2016). Glycosylation plays an important role in the

thermostability, folding, as well as the overall charge of a protein and can influence its protein-protein interactions (Arey, 2012). The injection of different forms of ApoD, including monomers, dimers, tetramers, and EV containing ApoD – as well as differently glycosylated ApoD – could also give different results.

In conclusion, our study shows for the first time that hApoD can efficiently exit the brain, most likely by active passage through the BBB and reach metabolic and excretory tissues. The characterization of hApoD's distribution pattern represents an important advance in the understanding of ApoD function and correlates well with its known functions. The high amount of hApoD found in the liver and urine in our experiments suggests that ApoD may have a role in the excretion and recycling of brain lipids. Our results also suggest that ApoD accumulation in peripheral tissues is likely dependent on BSG and influenced by its glycosylation levels. ApoD's capacity to leave the brain is likely more complex and might not depend on BSG. However, it remains unclear what receptor other than BSG participates in this process. Furthermore, ApoD's own glycosylation and incorporation into EVs is also likely to influence ApoD cell internalization and tissue distribution.

Authors Contributions

FD, VH, GR, MP and GDF performed the experiments. FD, VH and KFB wrote the manuscript. CM CR, KFB and ER edited the manuscript and supervised the study. FD and VH are co-first authors. CR and CM are co-last authors. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Disclosure Statement

The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

Institutional Review Board Statement:

The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki, and approved by the Animal Care and Use Committee of Université du Québec à Montréal (protocol #913).

4.8 Acknowledgements

We are grateful for the financial support provided by the NSERC and the Louise & André Charron research chair on the Alzheimer disease. We are also grateful for the work accomplished by our interns: Doriane Gisquet, Annabelle Boudy and Audrey Girardeau.

4.9 Figure legends

Figure 4.1: hApoD injected in the brain accumulates in urine and liver. Radiolabeled proteins (Bovine Serum Albumin (BSA) and hApoD) were injected in mouse cerebral ventricles. Blood, urine and – after perfusion – organs were collected 3h post-injection. A) Radioactivity recovered in fluids and tissue homogenates (%) compared to the total radioactivity recovered in the whole body. Statistical significance was evaluated via a Student t-test: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (n=3 animals). B) Radiolabelled

proteins extracted from brain and urine and visualized by radiography. A representative electrophoresis gel is shown.

Figure 4.2: Circulating hApoD accumulates in specific metabolic organs. Radiolabeled proteins (Bovine Serum Albumin (BSA) and hApoD) were injected intravenously in mice. Blood, urine and – after perfusion – organs were collected 3h and 6h post-injection. A) Results are presented as the percentage of radioactivity recovered per gram of tissues. EAT: epididymal adipose tissue, SAT: subcutaneous adipose tissue, MAT: mesenteric adipose tissue, and BM: bone marrow. B) The heat map shows the accumulation of hApoD relative to albumin. Statistical significance was evaluated via a Student t-test: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ (n=4 animals).

Figure 4.3: Relative accumulation of hApoD in fluids and tissues. Relative accumulation of hApoD in fluids and tissues. Radiolabeled proteins (Bovine Serum Albumin (BSA) and hApoD) were injected intravenously in mice. Blood, urine and – after perfusion – organs were collected 3h and 6h post-injection. Results are presented for each A) fluid and B) organs as their average respective percentage of the total radioactivity recovered in the animals. Statistical significance was evaluated via a Student t-test: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ (n=4 animals).

Figure 4.4: hApoD is subject to endocytosis and transcytosis through bEnd.3 cells. The apical side of bEnd.3 cell monolayers was exposed to different concentrations of hApoD for 24h. A) Cells were immunostained for hApoD (red) and a tight junction marker (Claudin-5, green). Nuclei were stained with Hoechst (blue). Scale bar: 50 μ m.

B) Basal media proteins were immunoblotted for hApoD. Representative images are shown (n=3 independent experiments). Statistical significance for panels B and D was evaluated via a Student t-test: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ against the 0ng/ml (*) and 200 ng/ml (#) conditions.

Figure 4.5: Cyclophilin A competition does not reduce hApoD internalisation in bEnd.3 cells. A) Viability of bEnd.3 cells in the presence of cyclophilin A, at 1, 5 and 10 times the molar concentration of hApoD (13.33nM) used in the experiment. H₂O₂ was used as a control for the loss of cell viability. B) The apical sides of bEnd.3 cell monolayers were exposed to hApoD (13.33nM) for 24h. Cyclophilin A was included from the beginning of the experiment at a molar equivalent (1:1) or in molar excess (1:10) relative to hApoD. Cells were immunostained for hApoD (red). Nuclei were stained with Hoechst (blue). Scale bar: 20 μ m. Representative confocal sections are presented. C) Average hApoD signal per cell (5 images taken for each monolayer). Fluorescence was normalized by the number of cell nuclei. D) Basal media proteins immunoblotted for hApoD. E) Immunoblot of BSG in bEnd.3 and control tissues (FG, fully glycosylated; UndG, underglycosylated). Panels D and E are representative results. F) Quantification of LG-BSG expression relative to total BSG expression as compared to the brain (*) and liver (#). Statistical significance for panels A, C and F was evaluated via a Student t-test: *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ (n=3 independent experiments).

Figure 6: hApoD tends to accumulate in tissues expressing underglycosylated Basigin. A) Immunoblot of Basigin (BSG) in its multiple glycosylated forms (HG, highly glycosylated; LG, lowly glycosylated) in various tissues, including epididymal

adipose tissue (EAT), subcutaneous adipose tissue (SAT), mesenteric adipose tissue (MAT) and bone marrow (BM). Each well contained whole protein extracts from 20 μ g of tissue. A representative immunoblot is shown (n=4 animals). B) Correlations between average hApoD accumulation (% of recovered radioactivity per gram of tissue) and average expression level of different classes of glycosylated Basigin in various tissues, 3h (black) and 6h (grey) after IV injection. Inset: liver data eliminated from the correlation. Pearson's product moment correlations are presented: *p<0.05, **p<0.01 (n=4 animals).

Supplementary Figure 4.1. Protein integrity after radiolabelling

Supplementary Figure 2. A) Representative schematic of TEER measurement in a bEnd.3 endothelial monolayer model disposed on insert. B) Transendothelial electrical resistance (TEER) of bEnd.3 cells after seeding. TEER value for bEnd.3 cells above 30 Ω .cm² means that the monolayer is established. C) Permeability coefficient (Papp) values of Dextran 10kDa measured in bEnd.3 culture or without cells. Values are taken 12 days after seeding. D) Viability of bEnd.3 in presence of ApoD at 200 ng/ml and 400 ng/ml for 24h. Statistical significance for panels C and D was evaluated via a Student t-test: ****p<0.0001. n=3 independent experiments for all panels.

Supplementary Figure 3. HEPES circulation protocol validation. HEPES was circulated with a peristaltic pump at 2 mL/min for at least 5 minutes, until the buffer-diluted blood coming out was clear. An Evans Blue buffer was then circulated for 5

minutes, showing a proper coloring of tissues and circulatory system A-C) with exception to the brain B) and C) which remained clear.

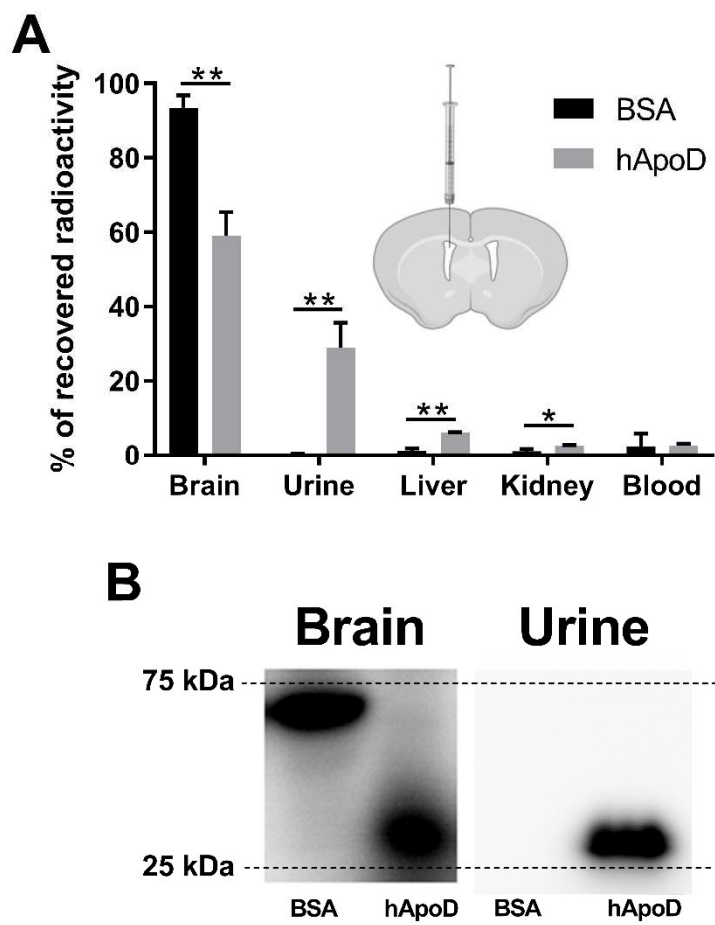


Figure 4.1.

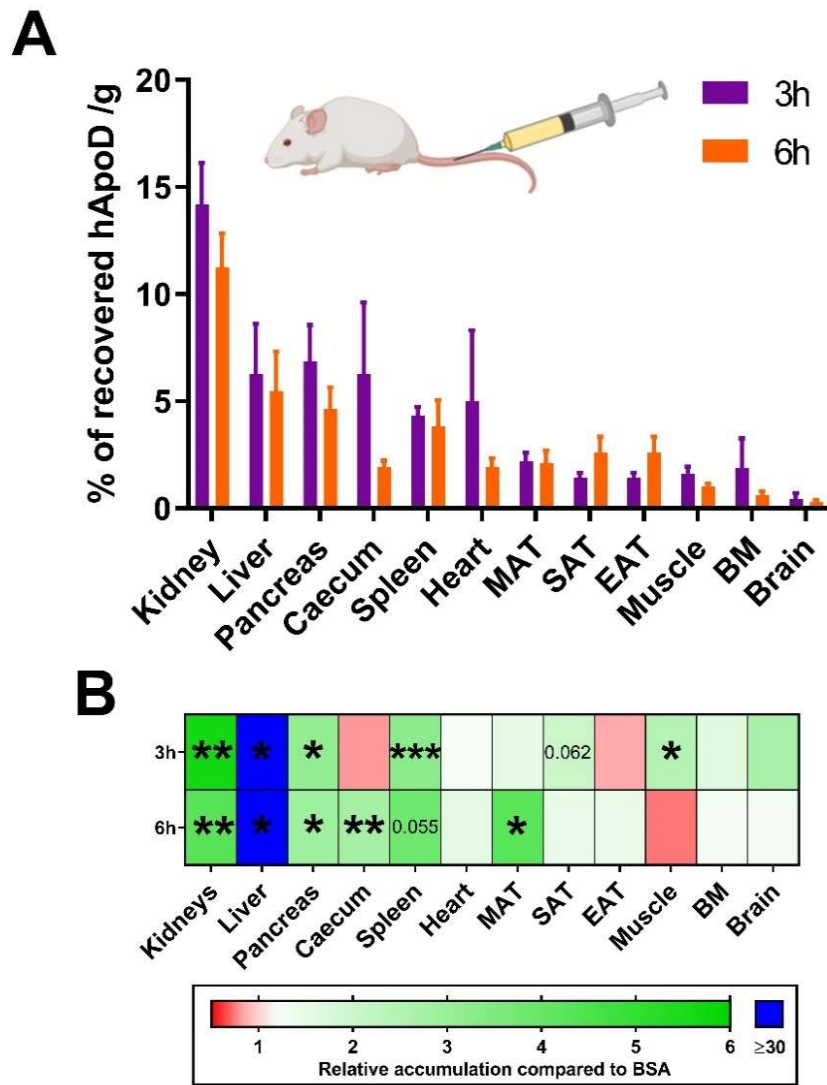


Figure 4.2.

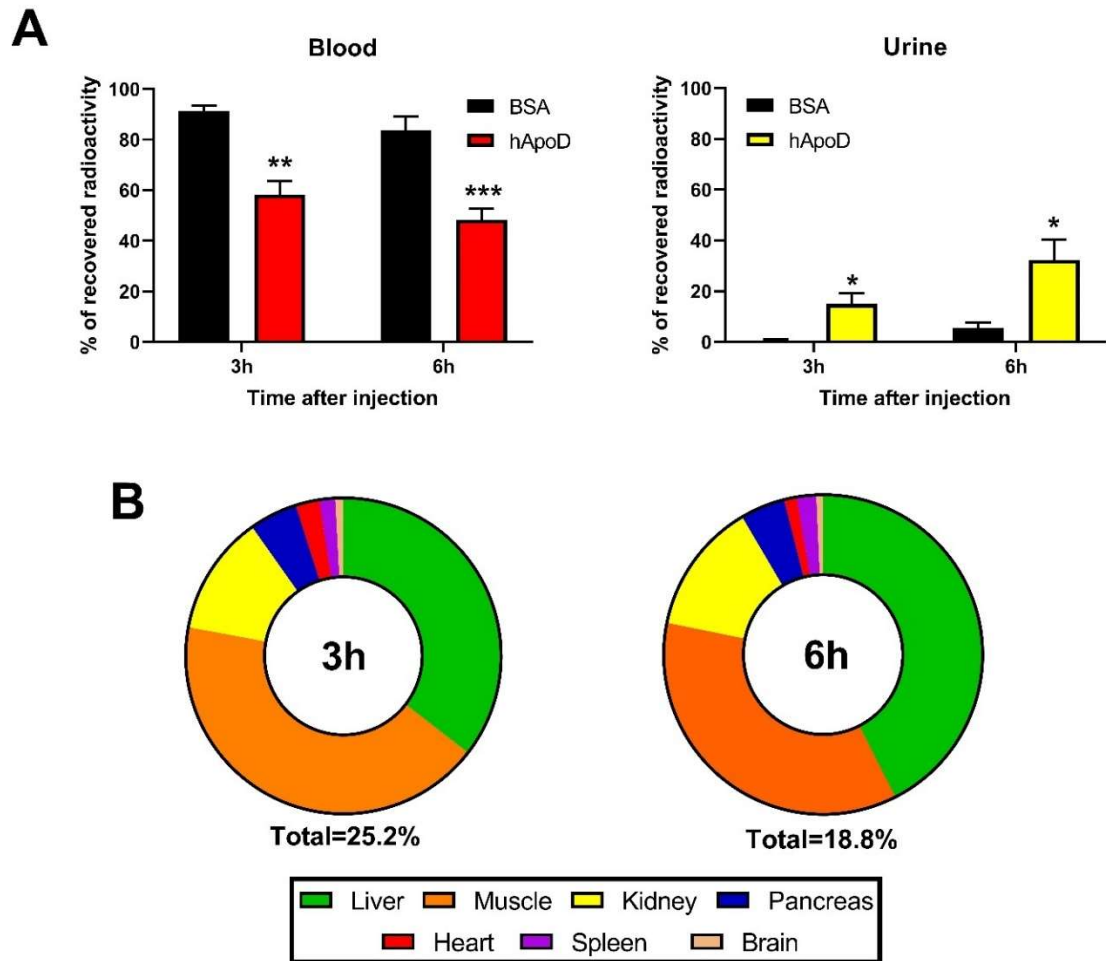


Figure 4.3.

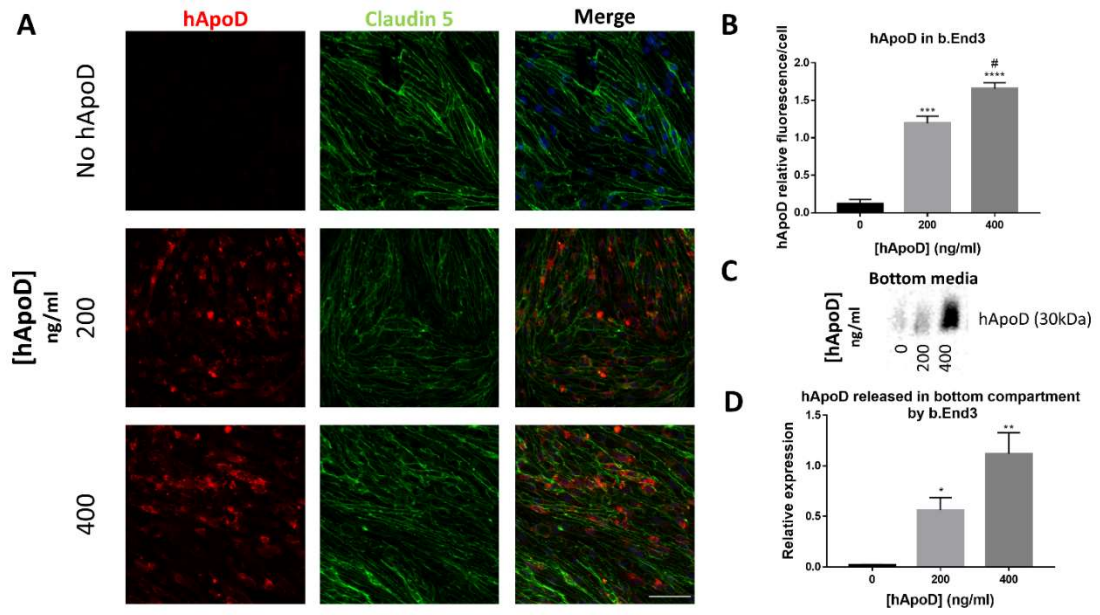


Figure 4.4.

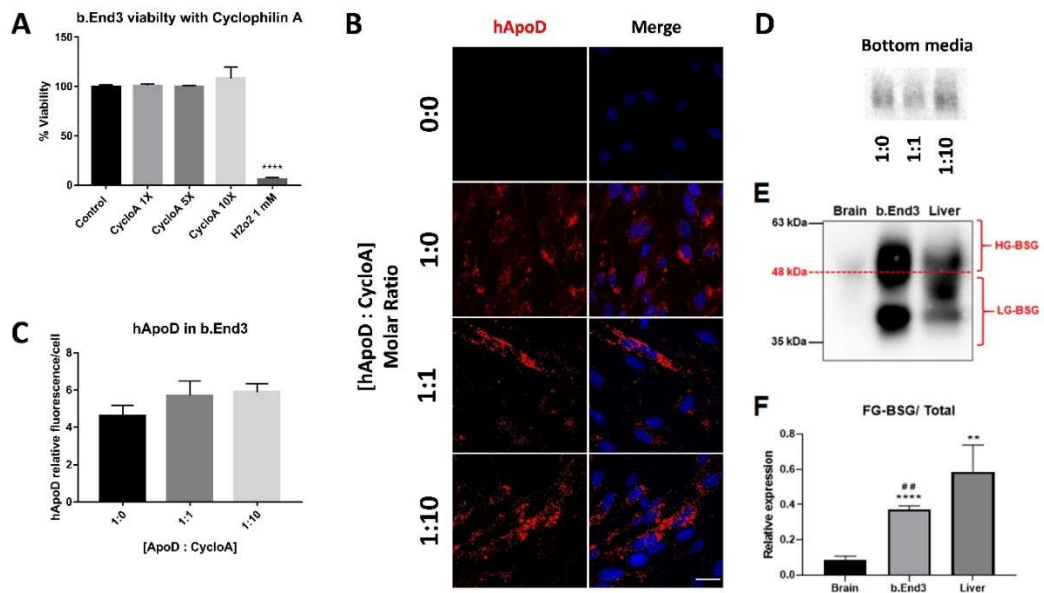


Figure 4.5.

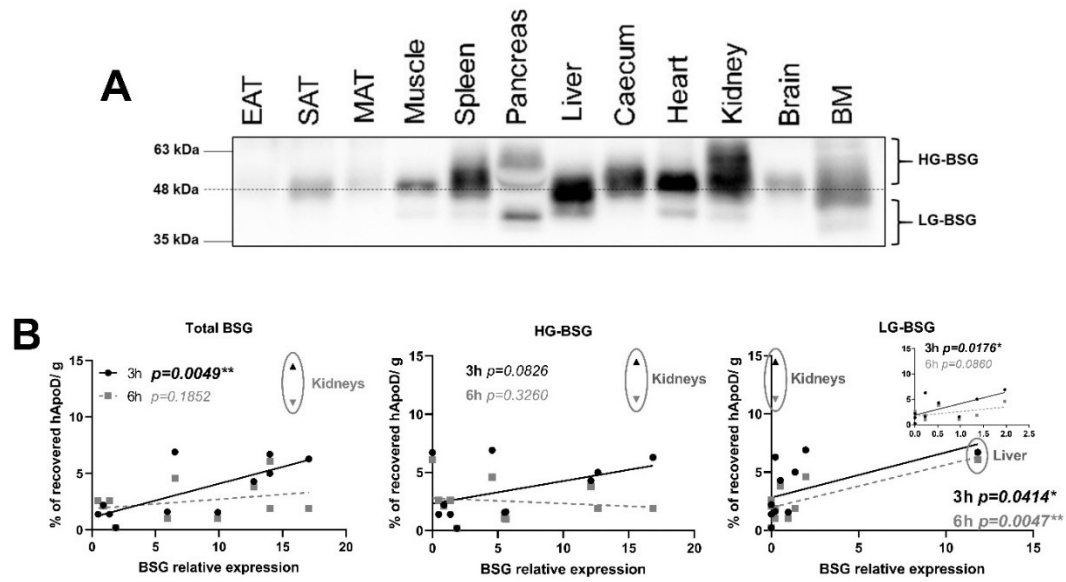


Figure 4.6.

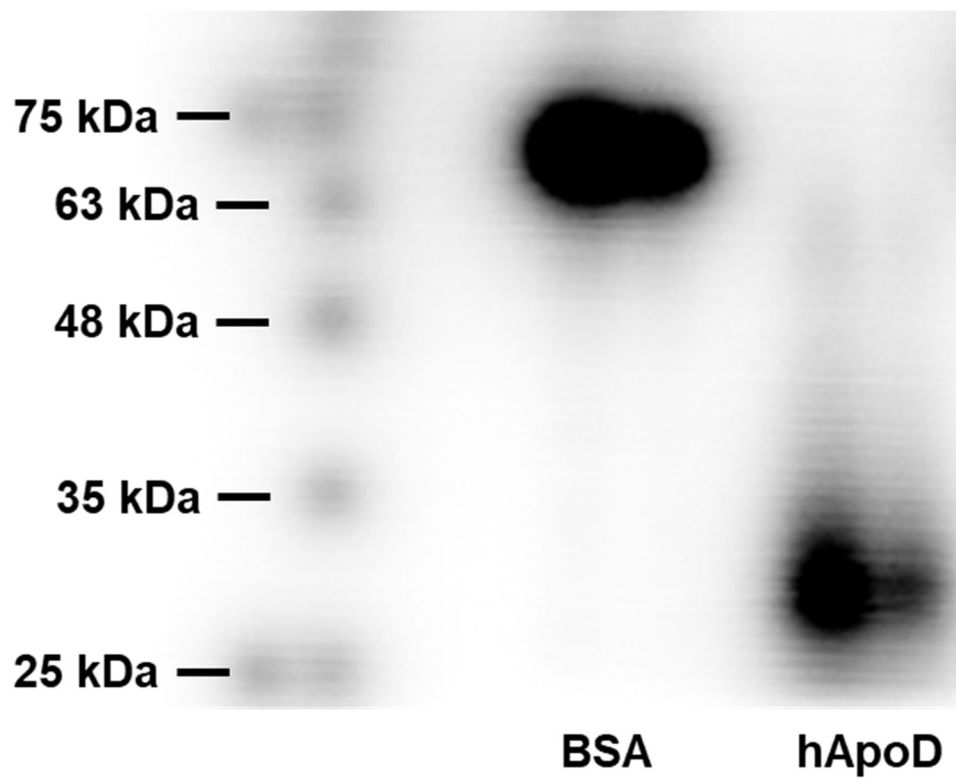


Figure supplémentaire 4.1.

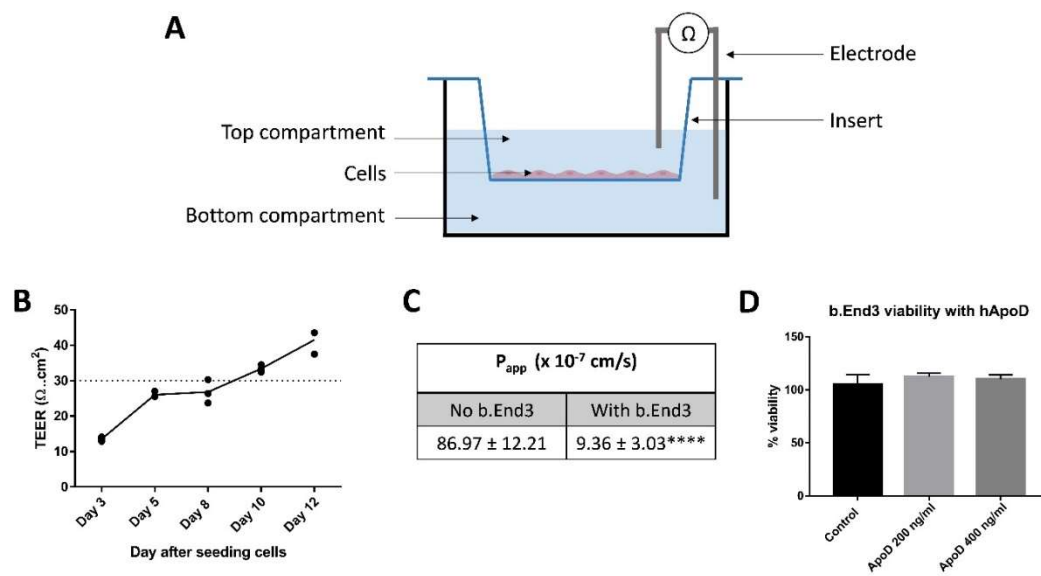


Figure supplémentaire 4.2.

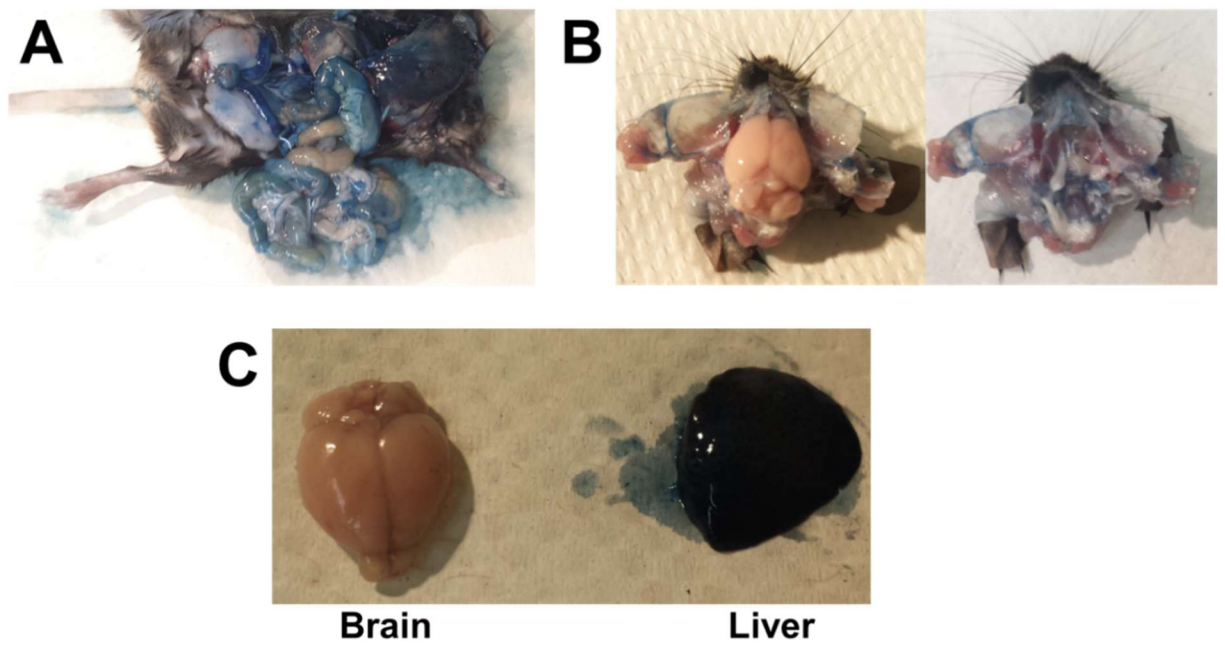


Figure supplémentaire 4.3.

CHAPITRE V

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

5.1 Conclusion

Le but principal des travaux effectués pour cette thèse était d'éclaircir les fonctions et l'impact de l'ApoD sur le métabolisme et l'inflammation métabolique. Avant les présents travaux, aucune donnée n'existait sur l'impact de l'ApoD sur l'obésité humaine ou animale. Nos travaux (chapitre II) ont permis de souligner que l'expression de l'ApoD dans les tissus adipeux et particulièrement dans le RL est associée à un meilleur profil métabolique et une inflammation réduite. Ces résultats s'ajoutent à ceux de la littérature indiquant que l'ApoD contribue à réduire l'inflammation des tissus où elle est présente.

Nos travaux ont également servi à explorer comment l'ApoD affecte le métabolisme hépatique et l'accumulation ou la rétention des acides gras oméga-3 et oméga-6 dans le foie. L'exploration de la pathogenèse de la stéatose hépatique des souris transgéniques hApoD a permis d'observer un phénomène inédit, soit une stéatose hépatique non inflammatoire. La stéatose hépatique traditionnellement observée chez l'humain et les animaux est généralement caractérisée par une accumulation d'acides gras sous la forme de triglycérides. En termes d'accumulation absolue (nmoles/g de tissu) cela se traduit particulièrement par une augmentation de la concentration hépatique d'acides gras saturés et mono-insaturés au détriment des acides gras polyinsaturés (P. Puri et al., 2007). L'accumulation excessive de ces acides gras, et en particulier celle des acides gras saturés à longues chaînes, dans les hépatocytes entraîne souvent des dommages cellulaires à la suite de la génération d'un stress oxydatif et d'un stress du réticulum endoplasmique (Estadella et al., 2013). Ces dommages cellulaires activent également les voies inflammatoires (Estadella et al., 2013). Parallèlement, une concentration intracellulaire trop forte de certains acides gras

saturés comme le palmitate peut également mener directement à l'expression et la maturation de certaines cytokines pro-inflammatoires comme nous l'avons décrit dans notre chapitre de livre sur le rôle de médiateurs lipidiques et de l'inflammasome dans les maladies cardiométaboliques (voir annexe A) (Karasawa et al., 2018). On attribue le nom de stéatohépatite non alcoolique ou NASH (*nonalcoholic steatohepatitis*) aux stéatoses hépatiques qui développent une inflammation chronique. Or, la NASH, si elle n'est pas traitée, peut progresser en fibrose, puis en cirrhose hépatique. De plus, la cirrhose hépatique est un environnement favorisant le développement de cellules cancéreuses, les hépatocarcinomes. Le développement d'une stéatose hépatique chez les souris hApoD était donc originellement fort inquiétant. Un des objectifs de recherche du Dr. Rassart était de démontrer que l'ApoD pourrait servir d'outil thérapeutique afin de limiter l'inflammation et les dommages neuraux chez les patients atteints de divers troubles neurodégénératifs. L'atteinte hépatique des souris hApoD représentait donc un frein important à ces démarches. Toutefois, les travaux effectués pour cette thèse montrent que la stéatose hépatique développée par les souris transgéniques est loin d'être traditionnelle. L'absence d'inflammation et de fibrose dans le foie de ces souris minimise grandement la gravité de la stéatose qui y est développée.

Un aspect intéressant est que l'accumulation de gras dans les tissus est une conséquence normale du vieillissement. Celle-ci est d'ailleurs visible chez nos souris WT vieillissantes. Près de la moitié des souris WT âgées de 12 mois avaient un score de Kleinner de 1 indiquant une faible stéatose. Tel qu'attendu chez ces souris, la proportion de PUFA diminuait progressivement avec l'âge en raison de l'accumulation d'acides gras saturés et mono-insaturés et donc la réduction progressive de la proportion relative des acides gras polyinsaturés. L'exacerbation de cette stéatose chez les souris WT, en suivant son cours naturel, devrait donc mener à l'établissement d'une inflammation chronique favorisée par l'envahissement du tissu par des

monocytes/macrophages de polarisation M1 (Stahl et al., 2020). Le déclenchement de l'inflammation est au moins en partie attribuable à la lipotoxicité qui se développe dans l'organe avec l'accumulation des acides gras saturés (Estadella et al., 2013). Une autre donnée importante est que malgré la forte accumulation lipidique dans le foie des souris hApoD âgée de 12 mois, il ne semble pas y avoir de dommages cellulaires. Les taux sanguins d'enzymes hépatiques (les aspartate transaminase (AST) et alanine transaminase (ALT)), biomarqueurs de ces dommages, sont normaux chez ces souris (Do Carmo, Fournier, et al., 2009). Cela porte à croire que le foie de ces animaux n'est pas substantiellement endommagé. Toutefois, la littérature nous indique que les AST et ALT des souris WT augmentent significativement avec l'âge (7 et 21 semaines comparativement à 24 mois) (Gregg et al., 2012). Si la stéatose des souris WT vieillissantes tend à rejoindre celle des souris hApoD, alors il est possible que leur foie dégénère davantage à un âge plus avancé que celui des souris hApoD. Cette hypothèse provient du fait que l'accumulation de PUFA et en particulier les oméga-3, dans le foie des souris transgéniques a potentiellement la capacité de limiter les dommages hépatiques (Abo El-Magd, El-Karef, El-Shishtawy, & Eissa, 2019; Frédéric Desmarais et al., 2020; El-Gendy et al., 2020; M. Wang et al., 2017). Les acides gras saturés, en contrepartie, ont des effets toxiques et pro-inflammatoires reconnus (Teng, Chang, Chang, & Nesaretnam, 2014). Nous nous trouvons donc dans une situation contre-intuitive où la stéatose hépatique observée chez les souris hApoD, caractérisée par une accumulation des PUFA et du maintien des ratios (saturés + mono-insaturés) /PUFA, pourrait même être considérée comme bénéfique chez les souris vieillissantes. Bien entendu cela dépend de la possibilité de développer un statut non inflammatoire chez les souris hApoD qui se maintienne après l'âge d'un an. Un élément qui semble indiquer que ce concept soit potentiellement véridique est que les souris hApoD ont une espérance de vie de 25 à 30% plus élevée que les souris WT malgré le développement de leur stéatose (Do Carmo et Rassart; données non publiées). Bien entendu, d'un point de vue métabolique, il serait encore plus souhaitable que les tissus

vieillissants des souris hApoD n'accumulent tout simplement pas d'acide gras. Cela expose toutefois le fait qu'en raison de sa nature toute particulière, le développement de la stéatose non inflammatoire des souris hApoD n'est pas aussi gravissime qu'initialement anticipé. L'inconvénient majeur de celle-ci, en absence d'inflammation et de fibrose, est une hyperinsulinémie et une résistance à l'insuline plus importante chez les souris hApoD que chez les souris WT (Do Carmo, Fournier, et al., 2009). En plus de de l'inflammation, certains métabolites issus de la synthèse des triglycérides peuvent également inhiber la signalisation de l'insuline (C. Zhang, Klett, & Coleman, 2013). Or, la production de triglycérides est plus élevée chez les souris hApoD que chez les souris WT (Labrie et al., 2015). Paradoxalement, le niveau d'accumulation protéique de l'ApoD dans certains tissus adipeux est associé à une meilleure sensibilité à l'insuline chez les femmes très obèses. Un effet qui pourrait être médié par la réduction de l'inflammation systémique. La présence accrue d'ApoD semble donc avoir une balance de coûts/ bénéfiques entre l'augmentation du contenu lipidique tissulaire et la réduction de l'inflammation sur la sensibilité à l'insuline. Des injections d'ApoD chez des patients obèses souffrant d'inflammation et déjà résistants à l'insuline aurait le potentiel d'être grandement bénéfique. Aussi, considérant les effets débilitants et souvent fatals des maladies neurodégénératives, il n'est pas inconcevable d'utiliser un jour l'ApoD comme outil thérapeutique chez les patients souffrant de maladies neurodégénératives.

Une haute expression d'ApoD pourrait également se traduire en des effets hépatoprotecteurs dans l'obésité. Nous avons déjà indiqué que la présence de l'ApoD dans le tissu adipeux est positivement liée à une meilleure santé métabolique chez des patientes sévèrement obèses (F. Desmarais et al., 2018). En plus de cela, nos données *in vivo* chez la souris indiquent que l'ApoD est liée à une conservation des proportions d'acides gras polyinsaturés au cours du vieillissement. L'ApoD pourrait donc avoir le

potentiel d'aider à maintenir les taux normaux de PUFA dans le foie des individus obèses et réduire l'inflammation hépatique.

Une autre implication de nos résultats est que l'ApoD puisse transporter un plus large éventail de ligands qu'initialement anticipé. Il est bien sûr connu que l'ApoD est en mesure de transporter l'ARA. Une augmentation d'un transport d'ARA vers le foie pourrait expliquer l'augmentation de l'accumulation hépatique d'acides gras oméga-6. Toutefois, cela n'explique pas l'accumulation encore plus importante d'acides gras oméga-3. Ce phénomène pourrait toutefois être expliqué si l'ApoD pouvait également lier des acides gras oméga-3. Or, l'affinité de l'ApoD pour les omégas-3 n'a jamais été testée, contrairement aux oméga-6. Cela représente donc une autre avenue de recherche à explorer.

Il faut également prendre en compte que l'accumulation hépatique des PUFA chez les souris transgéniques pourrait se faire au détriment d'autres tissus. Il est fort possible que l'ApoD participe au transport d'acides gras des tissus périphériques jusqu'au foie. Cela est d'ailleurs compatible avec l'incorporation de l'ApoD aux HDL et avec le transport inverse du cholestérol. Or, les PUFA ne peuvent pas être initialement produits par les cellules de mammifères et proviennent plutôt de la diète. Les deux acides gras essentiels, soit l'acide linoléique (LA, oméga-6) et l'acide α -linoléique (ALA, oméga-3), ne peuvent être produits par l'humain ou la souris. Toutefois, les mammifères peuvent continuer le processus d'élongation et de désaturation à partir de ces deux acides gras afin d'obtenir d'autres PUFA plus complexes. Les oméga-6 par exemple, proviennent de la désaturation et de l'élongation de LA, l'oméga-6 précurseur. Dans ces conditions où l'ApoD pourrait contribuer à augmenter les proportions de tous les acides gras omégas dans le foie, il est possible de penser que d'autres tissus soient appauvris en ces mêmes acides gras. Toutefois, les proportions de ces acides gras oméga dans le cerveau des souris transgéniques (**Tableau 5.1**) semblent indiquer que

ce n'est pas le cas, du moins dans le cerveau. On observe toutefois une modulation de la proportion d'acide stéarique et vaccénique dans le cerveau des souris transgéniques hApoD (données non publiées), signe que le métabolisme lipidique cérébral est tout de même légèrement modulé par l'ApoD. Il est également possible que l'ApoD augmente la rétention et le recyclage des PUFA dans l'organisme et que l'augmentation de l'expression de l'ApoD n'entraîne pas une carence de PUFA dans d'autres tissus. En bref, cela soulève plusieurs questions quant au rôle de l'ApoD dans le métabolisme des acides gras polyinsaturés.

Tableau 5.1: Composition cérébrale en acide gras ces souris WT et hApoD

	Acides gras	WT		hApoD		<i>p-value</i>
		Proportion (%)	Écart-type	Proportion (%)	Écart-type	
C14:0	Acide myristique	0.144 ± 0.009		0.145 ± 0.015		0.429
C16:0	Acide palmitique	23.4 ± 1.0		23.2 ± 1.0		0.351
C16:1n7	Acide palmitoléique	0.29 ± 0.04		0.29 ± 0.05		0.421
C18:0	Acide stéarique	22.5 ± 0.9		21.7 ± 0.4		0.042*
C18:1n9	Acide oléique	42.0 ± 2.41		43.2 ± 1.81		0.201
C18:1n7	Acide vaccénique	2.76 ± 0.27		3.08 ± 0.17		0.028*
C18:2n6	Acide linoléique	0.80 ± 0.12		0.62 ± 0.073		0.107
C20:3n9	Acide de mead	0.20 ± 0.03		0.21 ± 0.02		0.456
C20:3n6	DGLA	0.12 ± 0.02		0.13 ± 0.01		0.189
C20:4n6	Acide arachidonique	1.71 ± 0.14		1.73 ± 0.13		0.422
C20:5n3	EPA	0.019 ± 0.001		0.018 ± 0.001		0.195
C22:5n3	DPA	0.027 ± 0.004		0.027 ± 0.003		0.392
C22:6n3	DHA	6.44 ± 0.51		6.10 ± 0.63		0.192

Évaluation de la proportion des acides gras dans le cerveau des souris WT et hApoD âgées de 12 mois (n=5 par génotype). Les acides gras mesurés incluent : l'acide dihomog- γ -linoléique (DGLA), arachidonique (ARA), α -linoléique (ALA), eicosapentaénoïque (EPA), docosapentaénoïque (DPA) and docosahexaénoïque (DHA). * $p < 0.05$

La dernière portion de nos travaux s'est attelée à déterminer si l'ApoD cérébrale avait la capacité de s'échapper du SNC pour aller s'accumuler dans les tissus métaboliques. Nous avons effectivement démontré que l'ApoD quitte le SNC pour aller s'accumuler

principalement dans les reins, l'urine, le foie et les muscles. La présence accrue de l'ApoD et non de l'albumine dans ces tissus périphériques, en plus de la capacité de l'ApoD à traverser les monocouches de cellules b.End3 suggère d'ailleurs l'existence d'un mécanisme actif favorisant la sortie de l'ApoD du cerveau. On en vient cependant à se questionner sur l'utilité biologique de ce phénomène. En dehors du muscle, les compartiments préférentiellement ciblés par l'ApoD ont des fonctions importantes d'excrétion et de recyclage. Or, l'ApoD est surproduite lors des stress neurodégénératifs et permet de limiter les dommages neuronaux et de limiter le relargage de lipides potentiellement toxiques (ARA et LPC par exemple) lors des bris cellulaires (Garcia-Mateo et al., 2014). Notamment l'ApoD stabilise l'ARA dans les phospholipides membranaires et prévient l'internalisation de l'ARA libre par les macrophages et prévient donc sa conversion en eicosanoïdes pro-inflammatoires (Elizabeth A. Thomas et al., 2003). Il est donc probable que l'ApoD fasse partie d'un système permettant d'escorter les quantités excédantes de ces lipides en dehors du SNC pour les acheminer au foie et aux reins où ils seront recyclés ou excrétés.

Suivant cette logique, nous aurions raison de nous attendre à observer une augmentation de la captation hépatique de certaines espèces lipidiques transportées par l'ApoD lors d'épisodes neurodégénératifs. Si ce mécanisme existe bel et bien, il serait donc plus évident lors d'atteintes cérébrales aiguës comme une encéphalite virale ou encore lors d'un accident vasculaire cérébral (AVC). Dans ces deux cas, l'expression d'ApoD est augmentée et est liée à une réduction neurale de l'inflammation, de la peroxydation des lipides et à une régénération neurale accélérée (Do Carmo et al., 2008; Rickhag et al., 2008). De façon intéressante, il a été montré que les taux circulants de différents lipides oxydés (F₂-isoprostanés, HETEs et produits d'oxydation du cholestérol) sont augmentés après un AVC et chez les patients atteints du Parkinson et de la fièvre de la dengue. Les taux urinaires des F₂-isoprostanés sont également plus élevés dans l'urine des patients 24 heures après leur AVC. Les F₂-isoprostanés sont des

produits d'oxydation de l'ARA, le ligand préférentiel de l'ApoD. Or l'ApoD est justement liée à une réduction des concentrations en F₂-isoprostanes. L'ApoD réduit la production de F₂-isoprostanes et de 7-ketocholesterols lors de l'excitotoxicité, soit la toxicité provoquée par la suractivation des neurones, provoquée par l'acide kaïnique *ex vitro* (X. He et al., 2009). Cet effet a d'abord été attribué à la capacité de l'ApoD à stabiliser l'ARA dans les membranes (X. He et al., 2009). Toutefois, il est également possible que l'ApoD puisse assister à la diminution *in vivo* des concentrations des F₂-isoprostanes en transportant les surplus d'ARA libres ou de certaines F₂-isoprostanes vers la périphérie. L'étude de He X *et al.* 2009 n'avait malheureusement pas mesuré la quantité d'ARA libre lié à l'ApoD dans le milieu extracellulaire après leur traitement à l'acide kaïnique. Si une part importante de l'ARA relâchée dans le milieu extracellulaire se retrouve liée à l'ApoD, alors cela renforcerait l'hypothèse d'un transport neuro-hépatique d'acides gras lors d'épisodes neurodégénératifs.

Un élément important de ce transport repose évidemment sur la capacité des tissus périphériques à internaliser l'ApoD. Cette capacité semble être influencée par le degré de glycosylation de la BSG. Les tissus exprimant principalement la BSG à un haut degré de glycosylation sont également caractérisés par une faible accumulation (radioactivité/ g de tissus) d'hApoD. Au contraire, les tissus présentant un faible degré de glycosylation montrent une plus haute accumulation spécifique d'hApoD. Le faible degré de glycosylation semble en effet favoriser l'accumulation hépatique de l'hApoD. Si l'interaction entre l'ApoD et la BSG est favorisée par un faible niveau de glycosylation de la BSG, il pourrait aussi être intéressant d'envisager que la glycosylation de l'ApoD influencerait cette interaction. L'ApoD est une protéine fortement glycosylée. Son niveau de glycosylation est d'ailleurs variable et dépend du tissu excréteur. La BSG, quant à elle, se retrouve entre les poids moléculaires de 27 à 66 kDa (Y. Bai, Huang, Ma, Jiang, & Chen, 2014). Chez la souris et l'humain, l'ApoD cérébrale est sous-glycosylée comparativement à l'ApoD plasmatique, ce qui résulte

en une différence de taille de 2 kDa entre les deux formes (H. Li et al., 2016). Il n'est pas inconcevable de penser que ce 2 kDa de différence puisse influencer l'interaction entre ces deux protéines. En ce sens, une des faiblesses de notre étude est que nous ayons utilisé de l'ApoD humaine purifiée à partir de fluide kystique (27 kDa, **Fig. supplémentaire 4.1**). Il n'est pas clair si cette différence de glycosylation a eu un impact sur nos résultats *in vivo*. En dehors de l'observation de la différence de taille, encore aucune étude n'a identifié des différences dans les fonctions résultant de la différence du degré de glycosylation de l'ApoD. Le choix de l'ApoD humaine isolée de fluide kystique provenait de considérations pratiques. Cette source d'ApoD permettait d'obtenir une grande quantité d'ApoD facilement. Il serait beaucoup plus difficile d'obtenir une grande quantité d'ApoD humaine produite à partir de cellules neurales humaines. L'approche la plus efficace pour obtenir cette ApoD serait d'utiliser un vecteur d'expression d'ApoD dans des lignées d'oligodendrocytes humains, de concentrer le milieu extracellulaire et de purifier l'ApoD. Cela nécessiterait toutefois une grande quantité de cellules transfectées afin d'obtenir l'ApoD nécessaire aux expériences. Malgré cette faiblesse, les résultats obtenus concordent avec les fonctions connues de l'ApoD dans la périphérie et confirme que l'ApoD, bien que surglycosylée dans notre étude comparativement à l'ApoD cérébrale (H. Li et al., 2016), a la capacité de quitter efficacement le cerveau et d'atteindre les tissus périphériques.

5.2 Perspectives

5.2.1 Étude de l'influence du degré de glycosylation sur l'interaction ApoD-BSG

Une des grandes questions qui reste à adresser est celle de l'impact de la glycosylation sur l'internalisation de l'ApoD par la basigine dans les tissus périphériques. Nous avons montré que le degré de glycosylation de la BSG est inversement corrélé au degré

d'accumulation spécifique de l'ApoD dans les tissus. Cependant, ce ne sont que des corrélations et cela reste donc à être démontré formellement. Il serait donc important d'étudier comment le degré de glycosylation de ces deux protéines affecte leur interaction. Pour ce faire, plusieurs expériences pourraient être menées.

Ces expériences pourraient être inspirées de l'étude de Tang W *et al.* 2004 qui a permis de déterminer que l'interaction entre la BSG et la Caveolin-1 est dépendante du faible niveau de glycosylation de la BSG (W. Tang et al., 2004).

A) L'étude de Tang W *et al.* 2004 a démontré que la capacité d'interaction entre la BSG et la Caveolin-1 était dépendante du niveau de glycosylation lié à l'atome d'hydrogène des résidus d'asparagine («*N-linked glycosylation*») de la BSG. La première étape d'une étude d'interaction entre l'ApoD et la BSG serait de mesurer l'incidence de la délétion de ces glycosylations sur la liaison entre ces deux protéines. Concrètement, des cellules épithéliales HT1080 en culture pourraient être traitées avec diverses concentrations (0, 5 et 10 µg/ml) de tunicamycine pendant 12 heures.

Les cellules HT1080 ont la caractéristique de principalement exprimer robustement la BSG avec un niveau médian (HG-BSG, ~47 kDa) et faible (LG-BSG, ~32 kDa) de glycosylation sans exprimer la forme complètement glycosylée (FG-BSG, 66 kDa). On ne retrouve pas non plus un niveau non glycosylé de BSG (UnG-BSG, 27 kDa) dans ces cellules. Cette caractéristique et le fait qu'elles poussent facilement en culture et sont aisément transfectables, avaient justifié leur utilisation dans l'étude de Tang W *et al.* 2004. L'utilisation précédente de ces cellules dans une autre étude similaire justifie également leur utilisation. Toutefois, les cellules épithéliales ne sont pas nécessairement les cellules les plus pertinentes considérant nos précédentes études. On pourrait également songer à utiliser des hépatocytes ou des cellules endothéliales

hépatiques primaires de souris à condition que le degré de glycosylation dans ces cellules soit comparable aux cellules HT1080.

La tunicamycine est un inhibiteur du processus de la « *N-linked glycosylation* ». De l'ApoD purifiée serait ensuite ajoutée au milieu extracellulaire. Pour faciliter les expériences à ce point ci, de l'ApoD purifiée à partir de fluides kystiques (surglycosylée) serait d'abord utilisée. Suivant une incubation, le milieu extracellulaire serait récolté et les cellules seraient lysées. La déglycosylation de la BSG serait d'abord validée par immunobuvardage de type Western après avoir effectué une immunoprécipitation de la BSG. L'efficacité de la déglycosylation devrait être proportionnelle à la concentration de tunicamycine utilisée. La condition 5 µg/ml de tunicamycine devrait idéalement encore posséder une faible quantité de BSG glycosylée. Un immunobuvardage de type Western contre l'ApoD serait ensuite effectué sur la fraction immuno-précipitée de la BSG. Un immunobuvardage contre l'ApoD serait également effectué sur le lysat cellulaire et le milieu extracellulaire concentré afin de servir comme contrôle. Si le niveau de glycosylation de BSG est effectivement un facteur dans l'internalisation de l'ApoD, alors on devrait observer des bandes plus fortes d'ApoD dans la fraction immuno-précipitée et dans le lysat cellulaire dans les conditions avec un traitement à la tunicamycine.

Une amélioration potentielle de l'expérience décrite plus haut serait peut-être d'utiliser également une lignée cellulaire exprimant la forme maximale glycosylée de la BSG (FG-BSG, 66 kDa) en plus des cellules HT1080. Cela nécessiterait cependant d'effectuer des immunobuvardages de type Western sur les lysats cellulaires de plusieurs autres lignées cellulaires. Considérant le haut niveau de glycosylation présente dans les muscles chez la souris, dans nos expériences, une lignée cellulaire musculaire pourrait être idéale. Une évaluation des différents degrés de glycosylation de la basigine dans les lignées cellules musculaires de souris n'est pas, à ma

connaissance, disponible dans la littérature. Ce travail devrait donc être fait au préalable sur plusieurs lignées cellulaires pour que des cellules musculaires puissent être utilisées.

L'expérience décrite plus haut pourrait également être réalisée avec de l'ApoD purifiée de différentes sources (fluides kystiques et oligodendrocytes en cultures) afin de déterminer si la glycosylation de l'ApoD influence également l'interaction avec la BSG.

B) Si les expériences avec la Tunicamycine confirment que le degré de glycosylation de la BSG, et possiblement ceux de l'ApoD, affecte l'interaction BSG-ApoD, des expériences supplémentaires pourraient être effectuées afin de clarifier quels résidus glycosylés inhibent l'interaction entre l'ApoD et la BSG. Trois sites de N-glycosylation sont présents sur la BSG sur les asparagines Asn160, Asn268 et Asn302 (figure 5.1).

```

1   Met Ala Ala Ala Leu Phe Val Leu Leu Gly Phe Ala Leu Leu Gly Thr His Gly Ala Ser
   Aug gcg gcu gcg cug uuc gug cug cug gga uuc gcg cug cug ggc acc cac gga gcc ucc 20

21  Gly Ala Ala Gly Phe Val Gln Ala Pro Leu Ser Gln Gln Arg Trp Val Gly GLY Ser Val
   ggg gcu gcc ggc uuc guc cag gcg ccg cug ucc cag cag agg ugg gug ggg ggc agu gug 40

41  Glu Leu His Cys Glu Ala Val Gly Ser Pro Val Pro Glu Ile Gln Trp Trp Phe Glu Gly
   gag cug cac ugc gag gcc gug ggc agc ccg gug ccc gag auc cag ugg ugg uuu gaa ggg 60

61  Gln Gly Pro Asn Asp Thr Cys Ser Gln Leu Trp Asp Gly Ala Arg Leu Asp Arg Val His
   cag ggu ccc aac gac acc ugc ucc cag cuc ugg gac ggc gcc cgg cug gac cgc guc cac 80

81  Ile His Ala Thr Tyr His Gln His Ala Ala Ser Thr Ile Ser Ile Asp Thr Leu Val Glu
   auc cac gcc acc uac cac cag cac gcg gcc agc acc auc ucc auc gac acg cuc gug gag 100

101 Glu Asp Thr Gly Thr Tyr Glu Cys Arg Ala Ser Asn Asp Pro Asp Arg Asn His Leu Thr
   gag gac acg ggc acu uac gag ugc cgg gcc agc aac gac ccg gau cgc aac cac cug acc 120

121 Arg Ala Pro Arg Val Lys Trp Val Arg Ala Gln Ala Val Val Leu Val Leu Glu Pro Gly
   cgg gcg ccc agg guc aag ugg guc cgc gcc cag gca guc gug cua guc cug gaa ccc ggc 140

141 Thr Val Phe Thr Thr Val Glu Asp Leu Gly Ser Lys Ile Leu Leu Thr Cys Ser Leu Asn
   aca guc uuc acu acc gua gaa gac cuu ggc ucc aag aua cuc cuc acc ugc ucc uug aau 160

161 Asp Ser Ala Thr Glu Val Thr Gly His Arg Trp Leu Lys Gly GLY Val Val Leu Lys Glu
   gac agc gcc aca gag guc aca ggg cac cgc ugg cug aag ggg ggc gug gug cug aag gag 180

181 Asp Ala Leu Pro Gly Gln Lys Thr Glu Phe Lys Val Asp Ser Asp Asp Gln Trp Gly Glu
   gac gcg cug ccc ggc cag aaa acg gag uuc aag gug gac ucc gac gac cag ugg gga gag 200

201 Tyr Ser Cys Val Phe Leu Pro Glu Pro Met Gly Thr Ala Asn Ile Gln Leu His Gly Pro
   uac ucc ugc guc uuc cuc ccc gag ccc aug ggc acg gcc aac auc cag cuc cac ggg ccu 220

221 Pro Arg Val Lys Ala Val Lys Ser Ser Glu His Ile Asn Glu Gly Glu Thr Ala Met Leu
   ccc aga gug aag gcu gug aag ugc uca gaa cac auc aac gag ggg gag acg gcc aug cug 240

241 Val Cys Lys Ser Glu Ser Val Pro Pro Val Thr Asp Trp Ala Trp Tyr Lys Ile Thr Asp
   guc ugc aag uca gag ucc gug cca ccu guc acu gac ugg gcc ugg uac aag auc acu gac 260

261 Ser Glu Asp Lys Ala Leu Met Asn Gly Ser Glu Ser Arg Phe Phe Val Ser Ser Ser Gln
   ucu gag gac aag gcc cuc aug aac ggc ucc gag agc agg uuc uuc gug agu ucc ugc cag 280

281 Gly Arg Ser Glu Leu His Ile Glu Asn Leu Asn Met Glu Ala Asp Pro Gly Gln Tyr Arg
   ggc cgg uca gag cua cac auu gag aac cug aac aug gag gcc gac ccc ggc cag uac cgg 300

301 Cys Asn Gly Thr Ser Ser Lys Gly Ser Asp Gln Ala Ile Ile Thr Leu Arg Val Arg Ser
   ugc aac ggc acc agc ucc aag ggc ucc gac cag gcc auc auc acg cuc cgc gug cgc agc 320

321 His Leu Ala Ala Leu Trp Pro Phe Leu Gly Ile Val Ala Glu Val Leu Val Leu Val Thr
   cac cug gcc gcc cuc ugg ccc uuc cug ggc auc gug gcu gag gug cug gug cug guc acc 340

341 Ile Ile Phe Ile Tyr Glu Lys Arg Arg Lys Pro Glu Asp Val Leu Asp Asp Asp Asp Ala
   auc auc uuc auc uac gag aag cgc cgg aag ccc gag gac guc cug gau gau gac gac gcc 360

361 Gly Ser Ala Pro Leu Lys Ser Ser Gly Gln His Gln Asn Asp Lys Gly Lys Asn Val Arg
   ggc ucu gca ccc cug aag agc agc ggg cag cac cag aau gac aaa ggc aag aac guc cgc 380

381 Gln Arg Asn Ser Ser
   cag agg aac ucu ucc

```

Figure 5.1 : Séquences de la BSG. Les Asn portant des glycosylations sont notées en rouge. Le codon correspondant à ces Asn sont notés en gras.

L'objectif serait donc ici de remplacer ces asparagines par un autre acide aminé et donc prévenir la glycosylation sur ces sites. Il faudrait idéalement remplacer ces asparagines par des glutamines afin de maintenir le plus possible les charges de la protéine et de ne pas accidentellement affecter le repliement de celle-ci. Il faudrait travailler sur un plasmide contenant la BSG lié à une étiquette d'assez grande taille (GFP par exemple) afin de pouvoir différencier la BSG endogène de la BSG mutée. C'est d'ailleurs la stratégie qui avait été utilisée dans l'étude de Tang *et al.* 2004. Un anticorps dirigé contre la GFP avait alors été utilisé lors des immunobuvardage afin d'identifier la protéine mutée. Il suffirait ensuite de faire des mutations ponctuelles (voir figure 5.2) afin de retirer les sites de glycosylations.



Figure 5.2 : Mutagenèses ponctuelles sur le gène BSG

Une fois les mutations A, B et C effectuées sur différents plasmides contenant le gène BSG, il faudrait ensuite effectuer la mutation B sur les mutants A et C afin d'obtenir les mutants AB et BC. L'opération serait répétée jusqu'à l'obtention des 6 mutants A, AB, ABC, AC, B, BC et C. Les plasmides pourraient ensuite être transfectés individuellement dans des cellules ayant une faible expression basale de BSG ou uniquement une expression de la forme entièrement glycosylée de la BSG. De l'ApoD purifiée serait ensuite ajoutée au milieu extracellulaire. Suivant une incubation, le milieu extracellulaire serait récolté et les cellules seraient lysées. La déglycosylation de la BSG serait d'abord validée par immunobuvardage de type Western après avoir effectué une immunoprécipitation de la BSG. Cette perte de glycosylation serait simplement observable par une réduction de la taille de la protéine chimérique (ex. BSG-GFP). Un immunobuvardage de type Western contre l'ApoD serait ensuite effectué sur la fraction immuno-précipitée de la BSG, mais également sur le lysat cellulaire et le milieu extracellulaire concentré. Si le faible niveau de glycosylation de BSG est positivement corrélé avec le niveau d'internalisation de l'ApoD, alors on devrait observer des bandes plus fortes d'ApoD dans les cellules transfectées avec les mutants. Dans l'étude de Tang *et al.* 2004, la condition menant à la plus forte quantité de calvolin-1 co-précipitée était celle comprenant la délétion des trois sites de glycosylation. Un résultat similaire serait attendu pour l'ApoD. Cette approche expérimentale comporterait aussi l'avantage d'utiliser une seconde technique, en plus des expériences avec la Tunicamycine, pour valider l'effet inhibiteur de la glycosylation de la BSG sur l'interaction BSG-ApoD.

5.2.2 Influence de BSG sur la sortie de l'ApoD du cerveau et son accumulation dans les tissus périphériques

Une autre composante de la question, ici explorée, est l'importance de la BSG pour l'internalisation de l'ApoD dans les tissus périphériques. Une des hypothèses du chapitre IV est que la BSG est impliquée dans l'internalisation de l'ApoD dans les tissus périphériques, mais qu'elle n'est peut-être pas impliquée dans la sortie de l'ApoD du cerveau. Un moyen potentiel de vérifier cette hypothèse serait d'utiliser des souris avec des délétions totales et tissus spécifiques de la BSG. Il faut toutefois diviser ce projet en plusieurs étapes.

A) Nous ne connaissons présentement pas le mécanisme permettant à l'ApoD de quitter le cerveau. Il n'est présentement pas clair si ce processus fait intervenir la BSG et si plusieurs types cellulaires en plus des cellules endothéliales de la BBB sont impliqués. Une première étape serait de déterminer si l'absence d'expression neurale de BSG réduit l'efficacité de sortie de l'ApoD. Comme plusieurs types cellulaires pourraient être impliqués dans ce processus, il serait prudent d'utiliser des souris BSG-« knockout » total (Igakura et al., 1998) pour cette expérience. Il suffirait ensuite de procéder à nouveau à des injections ICV d'ApoD et de BSA radiomarquée tel qu'elles ont été faites dans le chapitre IV. En comparant aux souris WT, il serait donc possible de déterminer si l'absence de BSG réduit la capacité de sortie de l'ApoD.

Si l'absence de la BSG ne réduit pas la quantité d'ApoD qui atteint la périphérie, alors il ne resterait qu'à mesurer l'accumulation de l'ApoD radiomarquée dans les tissus périphériques et déterminer si l'absence de BSG modifie la cartographie de bioaccumulation de l'ApoD dans les fluides et tissus périphériques. Dans ces conditions, si une plus forte quantité d'ApoD se retrouvait dans l'urine, cela confirmerait que le passage de la protéine dans le rein et dans l'urine se fait (au moins en grande partie) passivement par filtration glomérulaire.

B) Si la délétion de la BSG venait à bloquer la sortie de l'ApoD du cerveau, il faudrait alors procéder à une autre série d'injection, cette fois intravasculaire, chez les souris BSG-KO afin de déterminer si la BSG est effectivement impliquée dans l'internalisation de l'ApoD dans les tissus périphériques.

C) L'étude pourrait être poussée encore plus loin, soit au niveau cellulaire. Afin de mieux comprendre le rôle de l'ApoD dans l'environnement hépatique, il pourrait être utile de vérifier dans quels types cellulaires l'ApoD va s'accumuler. Bien que les hépatocytes soient le type cellulaire le plus important en terme de masse et de fonction dans le foie (gestion et transformation des acides gras), il n'est pas impossible que d'autres types cellulaires soient impliqués dans l'accumulation hépatique d'ApoD (chapitre IV) et de PUFA via l'ApoD (chapitres III). Tel que mentionné dans le chapitre III, une augmentation de l'expression gène *PGS2* et *PTGDS* survient à l'âge de 6 mois chez les souris transgéniques hApoD et est concomitant à la surproduction hépatique de la 15d-PGJ₂. Or, ces gènes sont responsables de l'expression des protéines COX-2 et L-PGDS, les enzymes permettant la production de la 15d-PGJ₂. Ce qui est intéressant, ici, c'est que les hépatocytes chez les mammifères adultes n'expriment pas ou peu la COX-2. L'augmentation de l'expression de la COX-2 est presque entièrement restreinte aux autres cellules hépatiques lors des inflammations aiguës. L'expression de la COX-2 par les hépatocytes est toutefois possible lors d'inflammations chroniques (Martin-Sanz et al., 2010). Toutefois, nous avons établi qu'il n'y avait pas de réelle inflammation dans le foie des souris transgéniques (F. Desmarais et al., 2019). Cela semblait indiquer qu'un ou d'autres types cellulaires pourraient être responsable de cette surproduction de 15d-PGJ₂. Un potentiel type cellulaire qui pourrait être impliqué est les cellules endothéliales tapissant les sinusoides du foie. Les cellules endothéliales expriment la L-PGDS et produisent la PGD₂, le précurseur de la 15d-PGJ₂ (Miyagi et al., 2005; Parmar et al., 2006; Parmar et al., 2005; Roman & Pekkan, 2012; Taba et al., 2000). Ce sont également les premières cellules qui seraient en contact avec l'ApoD

chargée de lipides à son arrivée dans le foie. De plus, ces cellules expriment également la BSG. Cette expression se caractérise par une bande à 33 kDa (LG-BSG) et une seconde bande à 66 kDa (HG-BSG) (Yan et al., 2015). Il serait donc intéressant de déterminer dans quels types cellulaires l'ApoD va s'accumuler dans le foie.

Pour ce faire, les différents types cellulaires hépatiques pourraient être récoltés et séparés chez des souris WT après les injections de protéines radiomarquées. Une perfusion intracardiaque dans la veine cave inférieure irriguant le foie est déjà effectuée lors du protocole d'injection afin de retirer le sang. Coïncidemment, cela est également la première étape du protocole de récolte des cellules primaires du foie. Il suffirait d'ajouter une étape de perfusion avec un tampon contenant de la collagénase afin d'ensuite récolter les cellules hépatiques. Ces cellules pourraient ensuite être séparées par type cellulaire par centrifugation, à l'aide d'un gradient Percoll et de la technique de « Magnetic-activated cell sorting » (Meyer, Gonelle-Gispert, Morel, & Buhler, 2016). La radioactivité serait ensuite mesurée et normalisée par la concentration protéique de chaque échantillon. Cela permettrait de déterminer avec précision quels types cellulaires hépatiques sont ciblés par l'ApoD circulante et permettrait de mieux comprendre la place de l'ApoD dans le métabolisme hépatique.

Il pourrait également être intéressant d'effectuer des observations microscopiques par immuno-fluorescence de l'ApoD humaine dans le foie des souris transgéniques hApoD (chapitre III).

D) Une dernière étude pourrait se rajouter à ce volet et qui concernerait la forme que prend l'ApoD à sa sortie du cerveau. Un des regrets quant aux expériences du chapitre IV est de ne pas avoir pu isoler l'ApoD plasmatique radiomarquée à sa sortie du cerveau. L'ApoD a en effet la capacité de circuler en étant liée aux lipoprotéines (majoritairement les HDL) (Camato et al., 1989), mais elle peut également se trouver

dans les exosomes sanguins (Cheow et al., 2016). L'ApoD, étant une protéine soluble, a également le potentiel de circuler librement comme l'albumine. L'étude de Camato R *et al.* 1989 avait évalué que 89% de l'ApoD retrouvée dans le plasma se trouvait à la surface des HDL. La majeure partie restante (10%) se trouvait dans la fraction protéique du plasma (Camato et al., 1989). Une donnée importante manquante est la forme qu'elle prend à sa sortie du cerveau. Cette information a le potentiel de grandement améliorer notre compréhension de fonctions et mécanismes extracérébraux de l'ApoD.

Pour étudier la question, il suffirait d'isoler les composantes plasmatiques des souris WT injectées avec de l'ApoD radiomarquée et de mesurer la radioactivité présente dans chaque type de particule et dans la phase protéique soluble. Le plasma contient trois grands types de vésicules extracellulaires. Les microvésicules ont un diamètre allant de 100 à 1000 nm. Les corps apoptotiques ont une taille de 1 à 4 µm. Les exosomes, eux, ont une taille de 30 à 150 nm (Brennan et al., 2020). Comme il existe un chevauchement dans les tailles des microvésicules et des exosomes, il peut être difficile de différencier ces deux types de vésicules uniquement en fonction de leur taille. Cependant, le contenu de ces deux types de vésicules permet de les différencier. Les exosomes sont formés par le repliement interne de l'endosome tardif. Par conséquent, les exosomes contiennent des protéines endosomales telles que la tetraspanine, CD9, CD63 et CD81. Cependant, les microvésicules provenant de cellules hématopoïétiques sont également enrichies en CD63 et CD81, ce qui représente un autre chevauchement entre exosomes et microvésicules. Il est donc généralement préférable de classer toutes les vésicules ayant un diamètre de 100 à 150nm comme petites vésicules extracellulaires (« *small extracellular vesicles* », sEVs) (Brennan et al., 2020). Les HDL, eux, ont une taille approximative de 5 à 14 nm. Cela est suivi des lipoprotéines de plus en plus grosses (LDL < VLDL < Chylomicron) (**Fig. 5.3**) (K. Li, Wong, Luk, Kim, & Raffai, 2018). Il

y a donc également ici un chevauchement de taille des plus grosses particules de LDL, les VLDL et chylomicrons avec les exosomes.

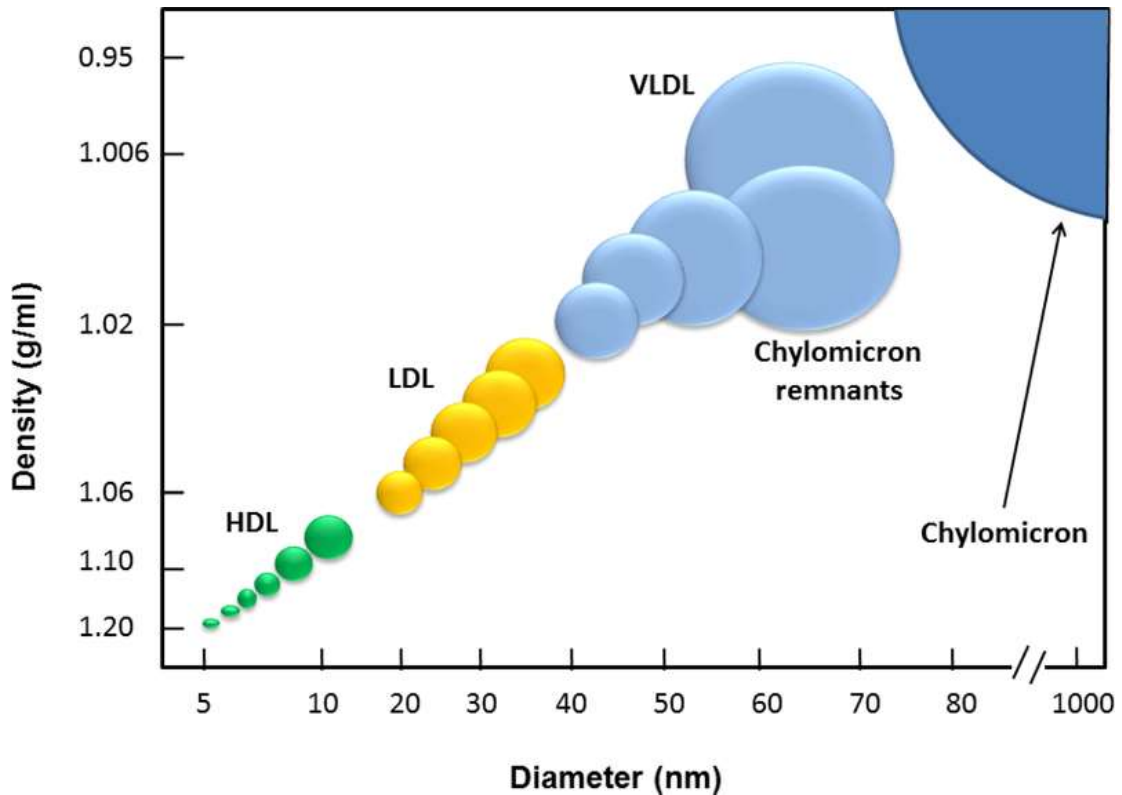


Figure 5.3 : Relation entre diamètre et densité des lipoprotéines. Tiré de Li K *et al.* 2018

Il ne semble présentement pas y avoir de méthode parfaite pour isoler efficacement chacune de ces populations de particules. Toutefois, une approche novatrice de séparation acousto-fluidique est en voie d'y parvenir. La méthode développée par Wu M *et al.* en 2019 a permis de séparer les vésicules extracellulaires et les sous-groupes de lipoprotéines en fonction de leurs propriétés acoustiques. La méthode de séparation

repose sur l'utilisation d'ondes ultrasoniques qui appliquent une force acoustique différentielle sur les particules et permet de les séparer à la fois en fonction de leur densité et de leur taille (**Fig.5.4**) (K. Lee, Shao, Weissleder, & Lee, 2015). En dehors des HDL et des LDL, ils sont parvenus à séparer ces divers groupes de particules et ils énoncent des pistes de solutions afin d'arriver à isoler ces dernières (Wu et al., 2019).

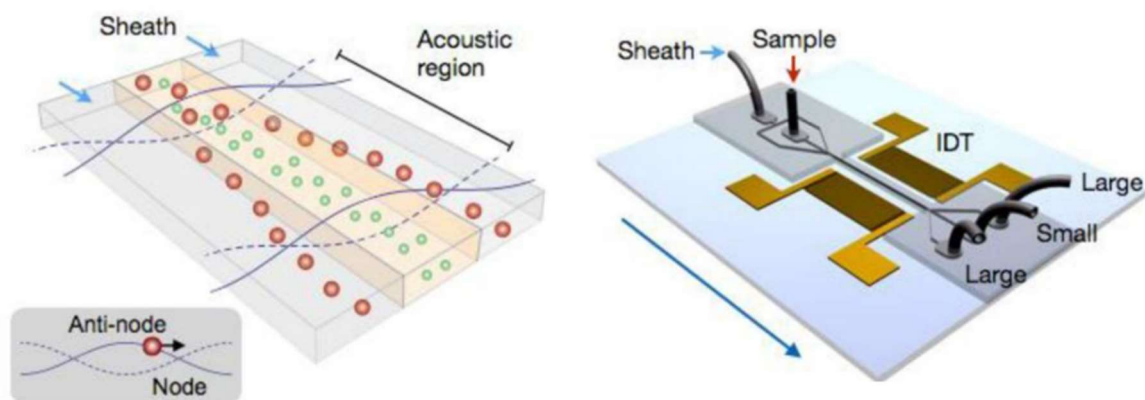


Figure 5.4: Principe de séparation des microvésicules extracellulaire par séparation acousto-fluidique. Image modifiée de (K. Lee et al., 2015).

5.2.3 Influence de BSG sur l'accumulation adipeuse de l'ApoD chez l'humain

Certains de nos résultats lient l'accumulation d'ApoD dans les tissus en fonction du niveau de glycosylation de la BSG. Cependant, ces résultats reposent strictement sur des observations effectuées dans le modèle murin. Or, les patrons d'expressions en ARNm et en protéines sont différents entre la souris et l'humain. Il serait intéressant de déterminer si des corrélations d'accumulation peuvent également être effectuées chez l'humain. Il suffirait de mesurer les niveaux d'expression des diverses formes de

BSG dans les tissus humains du chapitre II et d'effectuer ces corrélations. L'analyse de l'expression d'autres marqueurs inflammatoires pourrait également être réalisée afin d'avoir un bilan plus exhaustif des marqueurs inflammatoires. Plus particulièrement, il serait intéressant d'évaluer le niveau d'inflammation local des tissus adipeux ce qui permettrait de faire des corrélations avec l'inflammation tissulaire locale plutôt que l'inflammation systémique.

5.2.4 Investigation du transport neuro-hépatique d'acides gras médié par l'ApoD

Une des hypothèses principales de mes travaux est l'existence d'un mécanisme de transport neuro-hépatique d'acide gras toxiques lors des épisodes neurodégénératifs. Une grande quantité d'acides gras libres est relâchée à la suite d'une lésion cérébrale. Ces acides gras incluent les acides myristique, oléique, palmitique, docosahexaénoïque (DHA), linoléique (LA) et arachidonique (ARA). Dans le cas de l'ARA, sa concentration dans le CSF des patients 48h00 après un traumatisme crânien (~290 µg/L) est de 10 fois supérieure au niveau basal (~30 µg/L) (Pilitsis et al., 2003). Les prostaglandines, leucotriènes et autres eicosanoïdes produites à la suite du relâchement d'ARA sont alors une des causes menant aux dommages neurologiques secondaires (Unterberg, Wahl, & Baethmann, 1985). Il serait donc intéressant de déterminer si un relargage neural d'ARA se traduit en une accumulation hépatique ou même urinaire d'ARA. Il faudrait également déterminer si la surexpression et l'absence d'expression en ApoD influencent ce potentiel phénomène. L'ApoD peut être massivement surexprimée à la suite de dommages neurologiques et nerveux (incluant le système nerveux périphérique) (Rassart et al., 2020). Il est donc probable qu'elle puisse intervenir dans ces situations pour évacuer ces lipides en dehors du SNC.

Afin d'explorer ces questions, une démarche expérimentale faisant intervenir les souris transgéniques hApoD et ApoD KO est envisageable. Des injections ICV d'ARA radiomarqué chez les souris pourraient mimer le relâchement d'ARA qui a lieu lors des

traumatismes crâniens. Le processus d'injection aurait également le bénéfice de créer de légers dommages et de provoquer une légère inflammation. La simple augmentation de la concentration d'ARA devrait également engendrer une robuste inflammation recréant une partie des conditions neurologiques suivant un traumatisme crânien. L'ARA qui serait injecté dans le CSF des souris pour atteindre 290 µg/L serait bien entendu radiomarké. Ces injections auraient lieu chez les souris WT, hApoD et ApoD KO. Le protocole se déroulerait ensuite comme décrit pour les injections ICV d'ApoD et de BSA. Plusieurs temps de sacrifices post-injection devraient probablement être sélectionnés afin d'augmenter les chances d'observer de la radioactivité dans les tissus et fluides périphériques. Du CSF serait ensuite récolté à même les ventricules cérébraux des souris (McIntyre, Saville, & Fuller, 2019). Les autres fluides et tissus des souris seraient également récoltés et la radioactivité serait mesurée. Les tissus de souris non injectées seraient utilisés afin de mesurer le niveau basal de radioactivité tissulaire. On s'attendrait donc à observer une plus forte radioactivité spécifique (CPM/ mg de tissus ou par mL de fluide) dans le foie et potentiellement dans l'urine des souris hApoD, suivit des souris WT et potentiellement un niveau basal dans les souris ApoD KO. Au contraire, on s'attendrait à observer une plus forte radioactivité dans le CFS des souris ApoD KO, suivi des WT et enfin des hApoD.

Il est important de noter que les expériences, décrites ici, représentent une situation où un dommage neural aigu survient. Il est de mon avis que ces situations sont optimales afin d'explorer les fonctions de transports neuro-hépatiques de l'ApoD, si elles existent. Ces mécanismes existent probablement également dans les maladies neurodégénératives. Cependant ces maladies sont généralement complexes et font intervenir de multiples modulations du métabolisme lipidique, parfois bien longtemps avant l'apparition des premiers symptômes de neurodégénérescence. Il peut donc être difficile de discerner le rôle d'une protéine dans cette chaîne complexe d'évènements. La cause initiale de ces maladies est également parfois l'objet de débats. En

comparaison, les traumatismes crâniens et les encéphalites virales sont des pathologies avec une cause connue et un point d'initiation clair. Cet environnement est donc plus favorable à l'initiation de l'exploration de mécanismes de transports neuro-hépatiques d'acides gras toxiques.

5.2.5 Étude d'affinité de l'ApoD pour les oméga-3

Un autre élément intrigant des résultats du chapitre III sur la stéatose hépatique des souris hApoD est le patron d'accumulation des acides gras. Nos résultats indiquent un maintien de la proportion des acides gras oméga-3 et -6 malgré l'établissement de la stéatose. Cela se traduit en une accumulation de toutes les espèces lipidiques de ces deux familles. Particulièrement, cette accumulation se fait à l'avantage de la famille des oméga-3, puisque la proportion oméga-3/ oméga-6 est plus élevée chez les souris hApoD que chez les souris WT. Toutefois, si l'un des facteurs contribuant à l'initiation et au maintien de la stéatose est un transport d'ARA vers le foie médié par l'ApoD, on devrait plutôt observer un faible ratio oméga-3/ oméga-6. Une explication pourrait être que l'ApoD peut également lier et transporter des acides gras omégas autres que l'ARA. Notamment, on s'attendrait à observer une affinité de l'ApoD pour certains oméga-3. Il serait donc intéressant d'étendre les études d'affinités de l'ApoD à l'ensemble des acides gras oméga-3 et -6. Un autre élément indiquant la possible interaction de l'ApoD avec d'autres ligands provient de l'étude de Thomas EA et Yao JK sur les souris ApoD KO. Leur étude a révélé que le cerveau des souris ApoD KO contient une plus forte concentration de palmitate (C16:0), stéarate (C18:0), palmitoléate (C16:1), LA (C18:2n6), EDA (C20:2n6) et DHA (C22:6n3) que les souris WT. Des études ont déjà évalué l'affinité de l'ApoD pour certains de ces acides gras (**Tableau 1.1**). De telles expériences n'ont toutefois jamais été effectuées pour les oméga-3 comme le DHA.

Le but de cette étude serait donc de déterminer les K_a des acides gras oméga-3 et autres acides gras d'intérêt n'ayant pas déjà été mesuré, soit: ALA (C18:3n3), EPA (C20:5n3), DPA (C22:5n3), DHA (C22:6n3), GLA (C18:3n6) et DGLA (C20:3n6). Le palmitate, l'ARA et le LA pourraient également être utilisés comme contrôle de faibles et fortes affinités. Un premier criblage pourrait être effectué à l'aide de la technique de « *Electronic mobility-shift assay* » (EMSA). Un EMSA avait été utilisé à cette fin comme première étape dans l'étude de liaison de la Lazarillo (Sanchez et al., 2008). Après cette première étape, la mesure de K_a pourrait être effectuée à l'aide de la technique de résonance des plasmons de surface (« *Surface plasmon resonance* », SPR) (Fig.5.5). La SPR est utilisée afin de détecter et mesurer l'interaction entre deux différentes molécules ou protéines dans laquelle une des deux est fixée à une fine pellicule d'or. L'angle d'extinction de la lumière polarisée reflétée sur la pellicule permet ensuite de détecter de fines différences de masse. La liaison soudaine d'un ligand à la protéine fixée sur la pellicule peut donc être détectée (Stahelin, 2013). L'avantage de cette technique est que la pellicule d'or et les protéines qui y sont liées peuvent être réutilisées plusieurs fois. Il suffirait donc de fixer l'ApoD à la pellicule et faire circuler un des ligands dans un tampon approprié. Cette méthode a d'ailleurs déjà été utilisée afin de déterminer le K_D de la liaison du médiateur lipidique Mar1 avec le récepteur ROR α (Y. H. Han et al., 2019).

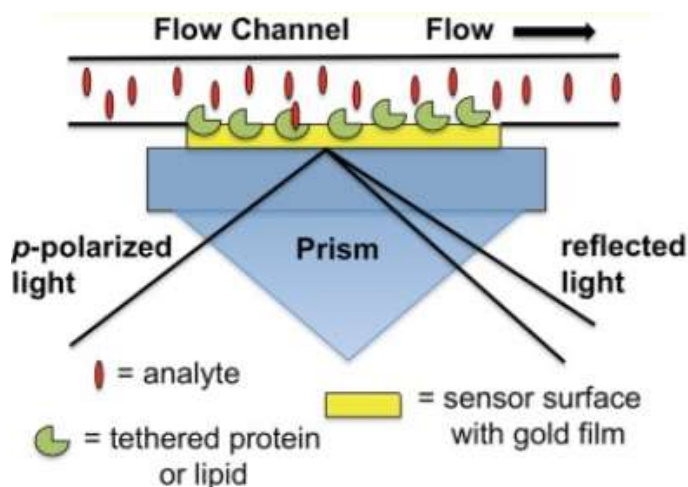


Figure 5.5 : Représentation schématique du système SPR. Modifié de Stahelin RV, 2013.

5.2.6 Impact métaboliques et comportementaux de l'ApoD dans l'obésité.

En dehors des considérations neurales, l'ApoD demeure un sujet d'étude intéressant dans le métabolisme lipidique et inflammatoire global. Notre compréhension du rôle de l'ApoD dans ces derniers, en dehors du cerveau, demeure cependant limitée. Notre étude sur le foie des souris hApoD indique que l'ApoD module le métabolisme des PUFA et de la synthèse des prostanoides. Cet effet serait délétère dans l'environnement hépatique (faible résistance à l'insuline et accumulation lipidique). En revanche, ce même effet offre son lot de bénéfices (maintien des ratios d'acides gras oméga/(saturés + mono-insaturés) et oméga-3/oméga-6, promotion de la polarisation M2 anti-inflammatoire). Ces effets surviennent bien sûr dans le contexte du vieillissement puisqu'ils n'apparaissent que très progressivement au cours de la vie des souris. Une

question qui demeure majoritairement non adressée est si l'ApoD peut offrir une protection métabolique et inflammatoire dans d'autres circonstances. Une telle circonstance qui vient immédiatement à l'esprit est bien sûr l'obésité. Les résultats du chapitre II indiquent que la concentration protéique d'ApoD dans le ligament rond et, dans une certaine mesure, dans le tissu adipeux mésentérique est liée à un meilleur bilan métabolique chez les femmes obèses. Ces résultats sont cependant limités au potentiel rôle de l'ApoD dans les tissus adipeux. De plus, une corrélation ne se traduit pas forcément en causalité. Il serait donc intéressant d'évaluer si la production d'ApoD dans un modèle murin d'obésité est effectivement liée à une amélioration des syndromes métaboliques.

Pour ce faire, il serait essentiel de disposer de souris exprimant l'ApoD à divers niveaux. Cette étude se baserait de nouveau sur les souris hApoD et WT comme pour l'étude de la stéatose hépatique (chapitre III), mais également sur les souris ApoD KO. Ces souris sont toutes trois maintenues sur un fond génétique C57BL/6J. Cette particularité est importante, car nous aurons besoin de souris qui sont prédisposées à développer des maladies cardiométaboliques. Il est donc important de maintenir la colonie en effectuant de croisements de routine avec les souris C57BL/6 provenant de la compagnie Jackson Laboratory (C57BL/6J). La lignée C57BL/6 est maintenant connue comme ayant subi une dérive génétique après avoir été distribuée à d'autres éleveurs. Ainsi, la susceptibilité de ces souris aux maladies cardiométaboliques varie en fonction des fournisseurs. Les souris C57BL/6J de Jackson Laboratory sont reconnues pour le fait qu'elles détiennent toujours cette susceptibilité. Il suffirait donc ensuite de rendre nos souris obèses, souffrant d'inflammation et résistantes à l'insuline avec une diète obésogène. Le choix de cette diète est toutefois primordial afin de générer une réelle inflammation. Pour ce faire, une simple diète riche en gras peut ne pas être suffisante. Une combinaison optimale de nutriment serait donc une diète riche en acides gras saturés à longue chaîne, une faible proportion de PUFA, un faible ratio oméga-3/

oméga-6 et une haute concentration de fructose. Le fructose est un sucre particulièrement connu pour ses effets pro-inflammatoire lorsqu'il est retrouvé en concentration suffisante (Glushakova et al., 2008). Cette diète est communément appelée sous le nom de « *High Fat, High Fructose diet* » (HFHFrD). La HFHFrD est particulièrement efficace à induire l'obésité, l'inflammation et parvient même à induire une fibrose hépatique, une pathologie qui est difficile à établir chez la souris (S. J. Han et al., 2016; Kohli et al., 2010; Radhakrishnan, Ke, & Pellizzon, 2020).

A) À partir de l'âge de 8 semaines et pour une période de 12 semaines, des souris WT, hApoD et ApoD KO seraient donc exposées à une diète HFHFr. La prise calorique et la dépense énergétique des souris serait mesurée à l'aide de cages métaboliques qui permettent de mesurer la consommation en nourriture et la dépense en oxygène. Les souris seraient également pesées 2 fois par semaine afin de suivre leur prise de poids. Des tests de tolérance au glucose et à l'insuline seraient effectués au début du protocole de diète (semaines 5 et 6), ainsi qu'à la fin du protocole (semaines 11 et 12). À la fin des 12 semaines de diète, les souris seraient sacrifiées et les tissus et fluides seraient récupérés. Il suffirait ensuite de mesurer les biomarqueurs de l'inflammation dans les tissus tel qu'ils ont été effectués pour le foie dans le chapitre III. Ces études seraient cependant élargies aux muscles squelettiques et aux tissus adipeux. Certains autres biomarqueurs d'intérêts, comme l'expression et l'activation de l'inflammasome NLRP3, pourraient également être ajoutés à l'étude. NLRP3 est une importante clef signalétique régissant les processus inflammatoires. Son activation est essentielle à la maturation des IL-1 β et IL-18, ainsi qu'à l'activation de caspases et mène à la mort cellulaire par pyroptose (voir annexe A pour plus d'information). Son activation permet de mieux distinguer entre une pression pro-inflammatoire (surexpression en ARNm de marqueurs inflammatoires) et une réelle et robuste inflammation menant à des dommages tissulaires. Les résultats attendus seraient une inflammation systémique et

tissulaire plus faible chez les souris hApoD et plus forte chez les souris ApoD KO, comparativement aux souris WT.

B) L'étude décrite en A) pourrait également être combinée à l'étude des potentiels effets de l'ApoD sur le comportement animal et l'adoption de comportement anxieux. L'inflammation métabolique qui survient en réponse à la consommation chronique de la diète occidentale est un facteur de risque dans le développement de l'anxiété et de la dépression. Lors d'une inflammation systémique, certaines cytokines comme l'interféron- α ont la capacité d'atteindre le cerveau et d'y induire l'activation de la microglie (Castanon, Luheshi, & Laye, 2015). Cela résulte alors également en une génération d'un signal inflammatoire dans le cerveau engendrant divers symptômes. Ce mécanisme a pour but de provoquer certains comportements chez l'hôte, comme la fatigue, la perte d'appétit et le retrait social. La raison d'être de ce mécanisme apparaît être de favoriser l'adoption d'un comportement permettant aux animaux d'augmenter leurs chances de survie lors d'infections. La capacité pour un individu de se retirer dans un environnement sécuritaire et de limiter la dépense énergétique favoriserait sa convalescence (Moieni & Eisenberger, 2018). Ce mécanisme apparaît toutefois être détourné dans l'obésité. L'inflammation métabolique générée chez les obèses agit similairement à celle produite lors d'infection et module plusieurs de voies signalétiques communes (Castro, Macedo-de la Concha, & Pantoja-Meléndez, 2017). Des différences notables entre les deux conditions inflammatoires sont toutefois l'intensité et la durée de ces inflammations. La réaction inflammatoire produite chez les obèses est de bas grade, mais chronique. Elle résulte donc en des effets moins prononcés, mais persistants (Castro et al., 2017). La diète occidentale manipule donc le microbiote intestinal et en favorise l'accumulation ectopique des lipides. Cela induit l'inflammation et contribue donc au développement de comportements dépressifs et anxieux (Soto et al., 2018).

L'intérêt d'étudier l'ApoD dans ces circonstances est que même s'il s'avérait que l'ApoD a peu d'effet protecteur sur l'inflammation systémique des souris obèses, elle a le potentiel d'avoir de profonds effets sur l'inflammation neurale et le comportement des animaux. Il serait donc intéressant de déterminer si le niveau d'expression de l'ApoD a effectivement une incidence sur ces paramètres. Il suffirait d'effectuer des tests comportementaux qui évaluent l'anxiété et la dépression chez les souris soumises aux HFHFrD et de déterminer si l'expression en ApoD (WT vs hApoD vs ApoD KO) a une incidence sur l'adoption de ces comportements. De tels tests comportementaux sont déjà bien établis et décrits dans la littérature (Bell et al., 2007).

5.2.7 Synthèse des perspectives

Les résultats de cette présente thèse montrent que l'ApoD, même de provenance neurale, a le potentiel d'influencer le métabolisme et l'inflammation extra-cérébrale. Ces résultats indiquent que l'ApoD pourrait être impliquée dans un mécanisme de transport neuro-hépatique d'acides gras. Ce mécanisme est à même d'être important dans la gestion des acides gras relâchés lors de troubles neurologiques. Plus encore, l'ApoD influence la gestion des PUFA et la production des prostaglandines dans le foie des souris. L'ApoD, dans certains tissus adipeux (principalement le ligament rond), est également associée à la réduction de l'inflammation systémique chez l'individu obèse. Dans l'ensemble, ces résultats indiquent que l'ApoD joue un rôle important, mais complexe dans le métabolisme et l'inflammation. Les perspectives de recherche proposées ici pourraient contribuer à préciser les subtilités et limites de ces rôles, ainsi que d'élucider les mécanismes qui les régissent. L'ApoD est une protéine ayant de multiples ligands et des multiples fonctions. Il ne fait selon moi aucun doute que de multiples générations d'étudiants seront encore nécessaires afin d'établir un portrait clair et final de ses fonctions.

ANNEXE A

LES MÉDIATEURS LIPIDIQUES ET L'INFLAMMASOME

FATTY ACID MEDIATORS AND THE INFLAMMASOME

Frédéric Desmarais, Karl F. Bergeron, James M. Ntambi, Eric Rassart and Catherine Mounier

Academic Press. Book Chapter. Editor name: James Ntambi. 2020; 197-221

Introduction

The global obesity crisis.

The global obesity crisis has steadily worsened in the last few decades. 39% of the world population can now either be considered overweight or obese. Many American countries (USA, Brazil, Mexico and Argentina) are leading this trend with an average overweight and obesity rates of 64.2% and 28.3% respectively (Chooi et al., 2019). While excess fat accumulation in adipose tissues is not by itself a major health issue, obesity's comorbidities are. Type two diabetes (T2D), hepatic steatosis, respiratory problems, cardiovascular diseases, and cancers are comorbidities responsible for the increased mortality of obese individuals (Gonzalez-Muniesa et al., 2017).

Role of inflammation in the genesis and progression of comorbidities

The commonality of most, if not all, of obesity's comorbidities is the presence of chronic inflammation that induces or exacerbate these pathologies (Saltiel & Olefsky, 2017; Yamashita et al., 2018). The impact of chronic inflammation on T2D has been studied exhaustively. Evidence shows that inflammation, through the action of cytokines, inhibits insulin signaling and induces insulin resistance in tissues. Reduced insulin sensitivity then results in an increased glycemia. This phenomenon is why T2D

is often referred as an inflammatory disease (Donath & Shoelson, 2011; Saltiel & Olefsky, 2017; Zozulinska & Wierusz-Wysocka, 2006).

The tumor necrosis factor- α (TNF- α) and the interleukin-1 β (IL-1 β) are two cytokines that are omnipresent in metabolic diseases. TNF- α and IL-1 β are overexpressed in the adipose tissues of obese animals and humans and disrupts insulin signaling at multiple levels (Jager, Gremeaux, Cormont, Le Marchand-Brustel, & Tanti, 2007; Nieto-Vazquez et al., 2008). For example, TNF- α induces the phosphorylation of insulin receptor substrate 1 (IRS-1) and -2 on serine residues leading to their inhibition. This then results in the inhibition of glucose transporter type 4 (GLUT4) mediated glucose uptake in tissues and hyperglycemia as well as hyperinsulinemia (Nieto-Vazquez et al., 2008). TNF- α can also inhibit the secretion of insulin by insulin-producing cells by activating a c-Jun NH₂-terminal Kinase (JNK)-dependent inhibition of insulin production (Agrawal et al., 2016). Meanwhile, IL-1 β reduces the expression of IRS-1 in adipocytes by an extracellular signal-regulated kinase (ERK) dependent pathway, thus reducing the insulin sensitivity of adipose tissues during prolonged inflammation (Jager et al., 2007). Endothelial cells as well as leukocytes can also produce IL-1 β . IL-1 β induces the expression of cyclooxygenase-2 (COX-2) and the production of prostanoids, a class of lipid mediators which are potent modulators of vasoconstriction/vasodilatation as well as effectors of the phenotypic signs of

inflammation, including leukocytes recruitment and endothelium hyperpermeability. Therefore, IL-1 β is also an important factor in cardiovascular diseases (Libby, 2017).

In addition to cytokines production, an important factor in chronic inflammation induced by obesity, is the continued presence and invasion of macrophages. It is however important to distinguish macrophages in two distinct groups in order to understand their role in metabolic diseases. Under normal physiological conditions, the macrophages that patrols tissues (resident macrophages) have a phenotype dedicated to the phagocytosis of dying cells (efferocytosis) and they help maintain an anti-inflammatory environment by secreting anti-inflammatory cytokines (IL4, IL-10). These macrophages are therefore ‘polarized’ in an M2 anti-inflammatory state (Kraakman, Murphy, Jandeleit-Dahm, & Kammoun, 2014). The M2 macrophages are mainly used to maintain homeostatic conditions and help in tissue remodeling. (S. J. Jenkins et al., 2011). However, monocytes/macrophages that invades the tissue in response to different pro-inflammatory stimuli, such as tissue damage, oxidative stress and the presence of pathogen, are M1 polarized macrophages. Their phenotype is therefore oriented toward the secretion of pro-inflammatory cytokines and lipid mediators. M1 macrophages also have reduced efferocytosis capabilities but an increased capacity for foreign organism phagocytosis (Korns et al., 2011). In the chronic low-grade inflammation found in obesity, the population of M1 macrophages

remains high and thus helps to maintain the tissue in a perpetual state of inflammation (Lumeng et al., 2007). The accumulation of M1 macrophages also correlates with the degree of insulin resistance in high-fat fed rodents (Fujisaka et al., 2009; Kraakman et al., 2014).

Contribution of the Western diet to obesity and inflammation

One of the causes responsible for the current obesity and T2D epidemic is the Western diet. It is a high fat, high cholesterol, high sugar diet, which is rich in saturated fat, with a high omega-6 to omega-3 fatty acids ratio (Simopoulos, 2006, 2016) and low proportion of fibers (Statovci et al., 2017). Chronic consumption of the western diet is considered an important risk factor in the development of all chronic inflammation diseases (Drake, Sonestedt, Ericson, Wallstrom, & Orho-Melander, 2018) since it impacts the biosynthesis of important lipid mediators that control the inflammatory environment.

From a signaling standpoint, the high dietary ω -3/ ω -6 ratio is particularly problematic. Lipids are multi-purpose molecules that have structural functions (such as cell membrane composition) and energetic functions (such as production of ATP by oxidation). In addition, lipids also serve as signaling molecules that can modulate inflammation. These lipids can be divided into different classes and have varying effects depending on their respective classes. These classes are the long chain fatty

acids (**LCFAs**), the medium chain fatty acids (**MCFAs**), the short chain fatty acids (**SCFAs**), the ω -3, ω -6 and ω -9 polyunsaturated fatty acids (**PUFAs**), as well as the **ceramides**. In this review we will focus on the roles of ω -3 and ω -6 PUFAs in the control of inflammation as these fatty acids are the main contributors of inflammation in a large majority of metabolic diseases.

The ω -3 fatty acids eicosapentaenoic acid (EPA), docosapentaenoic (n -3 DPA), docosahexaenoic (DHA) serves as precursors for the biosynthesis of local hormones commonly known as the lipid mediators docosanoids, while the ω -6 arachidonic acid (ARA) serves as the precursor for the eicosanoids. While docosanoids are essentially anti-inflammatory molecules, eicosanoids are generally pro-inflammatory. However, several anti-inflammatory functions have recently been found for a small portion of the eicosanoids and new anti-inflammatory members of this family have been discovered. This suggests a complex relationship between ω -6 fatty acid intake and inflammation regulation. Historically, humans evolved in an environment in which the dietary ω -3/ ω -6 ratio was 1:1. In modern diet, this ratio has shifted toward a ratio closer to 1:20 (Simopoulos, 2016). This intake imbalance disrupts the normal inflammatory balance leading to increased synthesis of pro-inflammatory eicosanoids (Kelley, Taylor, Nelson, & Mackey, 1998) and lower production of anti-inflammatory docosanoids (Katakura et al., 2015).

In human and mammalian species in general, the synthesis of the ω -3 precursors starts with α -Linolenic fatty acid (ALA, C18:3n3), is an essential fatty acid. Once absorbed by the organism, α -Linolenic fatty acid can be elongated and unsaturated to produce EPA (C20:5n3), then DPA (C22:5n3), and finally DHA (C22:6n3) (fig.2) (Guillou, Zadavec, Martin, & Jacobsson, 2010). The ω -6 ARA is produced through elongation and desaturation of its precursor Linoleic acid (LA). LA is commonly found in oil derived from plants such as safflower, sunflower and corn (Guillou et al., 2010; Lau, Cohen, Ward, & Ma, 2013). In most vertebrate species, LA is an essential fatty acid because of the absence of a Δ 12 desaturase capable of desaturation at the appropriate position in the hydrocarbon chain of the oleic acid (C18:1n9) (Gijon & Leslie, 1999; Guillou et al., 2010) (fig.2). Otherwise, ARA can also be acquired directly through consumption of multiple animal products such as chicken, eggs and beef ("Identification of top food sources of various dietary components," 2018). ALA is also an essential fatty acid. It is abundantly found in vegetal sources and particularly in rapeseeds and walnuts (Blondeau et al., 2015).

The elongation and unsaturation of linoleic acid (LA, 18:2n-6) to produce ARA (C20:4n6) requires many enzymes that are also necessary for the synthesis of ω -3 fatty acids from the ALA precursor. For example, the unsaturation of LA to γ -LA (18:3n-6) is catalyzed by the same Δ 6 desaturase (Fatty acid desaturase2, Fads2) used for the unsaturation of ALA to stearidonic acid (18:4n3). Elovl5 and Fads1 are then also shared

for further elongation and unsaturation (Guillou et al., 2010). However, these enzymes have a higher affinity toward the ω -3 fatty acids. Therefore, the relative abundance of ALA vs LA is an important factor that determines the EPA, DPA and DHA output versus ARA output and their availability for conversion into their metabolites. The excessive amount of LA, the ARA precursors, presents in the western diet represent a powerful competitive effect that redirect these synthetic enzymes toward the production of ARA and its derived inflammatory metabolites (Emken, Adlof, & Gulley, 1994; Husted & Bouzinova, 2016). A significantly decreased ω -3/ ω -6 ratio therefore results in excessive inflammatory reactions and delayed inflammation resorption. It can even result in a complete absence of resorption, and thus creates a state of chronic low-grade inflammation associated with obesity (Simopoulos, 2006).

Interestingly, the maintenance of an appropriate ω -3/ ω -6 ratio seems to be able to preserve an anti-inflammatory climate even under extreme conditions. Tissues, including the liver, naturally accumulates fat with age. The result of age-induced lipid accumulation in tissues is very similar to that of obesity-induced lipid accumulation, resulting in lipotoxicity, oxidative stress, inflammation and insulin resistance (Kuk, Saunders, Davidson, & Ross, 2009). This may be explained by a change in the lipid composition in the liver as the proportion of ω -3 fatty acids is reduced with age (F. Desmarais et al., 2019). Interestingly, our group showed that 12 months old transgenic mice overexpressing apolipoprotein D (ApoD) maintain the same proportion of PUFAs

as young mice (3 months old) (F. Desmarais et al., 2019). ApoD is thought to participate in PUFAs transport. It has been confirmed that ApoD binds and transport ARA (Morais Cabral et al., 1995), but while it is suspected that ApoD binds to ω -3 fatty acids, no study has yet confirmed it. It appears that under prolonged ApoD overexpression, a greater efflux of PUFAs are transported to and accumulated in hepatocytes. This results in a severe hepatic steatosis (averaging a Kleinner score of 2 out of 3) with high PUFAs concentrations. In transgenic mice, the liver presents a more favorable ω -3/ ω -6 ratio than their wild type counterparts. Despite this severe lipid accumulation, the inflammatory balance was maintained and that the hepatic steatosis did not progress to non-alcoholic steatohepatitis (NASH), showing that the nature of the lipids accumulated in organs is far more important than their overall quantity for inducing and controlling inflammation (F. Desmarais et al., 2019).

Regulation of inflammation in obesity

In the last decade, considerable advancements have been made in the understanding of the initiation and the resolution of the inflammation process. For a long time, inflammation was thought as a self-limited process initiated by the production of pro-inflammatory eicosanoids. It was thought that inflammation resorption was a passive process that occurs when these pro-inflammatory mediators stop being produced. It is only through the discovery of multiple pro-resolving lipid mediators, the specialized proresolving mediators (SPMs) derived from PUFAs, that this concept was laid to rest

(Serhan, 2017). Without these mediators, inflammation can continue, unhindered, for the full lifespan of the host. This is the case in obesity where multiple tissues are in a state of constant low-grade inflammation. Interestingly, SPMs synthesis is hindered in obesity, possibly by multiple mechanisms working conjointly and reviewed in later sections (Neuhofer et al., 2013).

The NLRP3 inflammasome

Since many NLRP3 activator signals, such as high concentrations of glucose and palmitate, are present in excessive amount in the Western diet, it is unsurprising that NLRP3 plays also a crucial role in metabolic disorders. NLRP3 is indeed overly expressed and activated in the metabolic tissues of obese individuals exposed to Western diet (Rheinheimer, de Souza, Cardoso, Bauer, & Crispim, 2017). This results in tissue damage and pro-inflammatory cytokines secretion that inhibits insulin signaling. In fact, the expression of NLRP3 is strongly correlated with insulin resistance and metabolic syndrome (Esser et al., 2013). This makes NLRP3 a priority target in the fight against metabolic diseases.

Inflammasomes are key modulators of inflammation and play a major role in metabolic diseases. The maturation of important cytokines (IL-1 β and IL-18), the onset of pyroptosis and the production of eicosanoid storms are dependent upon their activation.

Inflammasomes were first recognised as crucial elements in the defense mechanisms against pathogens (von Moltke, Ayres, Kofoed, Chavarria-Smith, & Vance, 2013) and are now known to be activated in metabolic (Vandanmagsar et al., 2011), autoimmune (C. A. Yang & Chiang, 2015) and neurodegenerative diseases (E. Lee et al., 2019) as well as cancer (Man, Karki, & Kanneganti, 2016; Wei et al., 2014; Zhong et al., 2016) and dysbiosis (Broz & Dixit, 2016; B. Hu et al., 2013).

The study of inflammasomes, in particular the NLRP3 inflammasome, has changed our perspective on how inflammation affects metabolic tissues. Inflammasomes are multiprotein platforms that acts as a sort of multistep “arming key” resulting in potent inflammatory responses. In addition, it was reported that NLRP3 activation has an inhibitory effect on SPMs synthesis (S. Lee et al., 2017). In a mice model of sepsis caused by cecal ligation and puncture, mice lacking *NLRP3*^{-/-} display less severe inflammation-induced symptoms and mortality. Genetic deficiency in NLRP3 resulted in reduced prostaglandin biosynthesis, inflammation and increased biosynthesis of lipids mediators such as lipoxins (particularly LXB₄, see details in subsequent sections). This suggests a role for the NLRP3 inflammasome in regulating the output of SPMs (S. Lee et al., 2017). The proposed mechanism for this regulation is that NLRP3 activation results in the inhibition of lipoxins synthesis in macrophages in a caspase-7-mediated pathway (S. Lee et al., 2017). Interestingly, inhibition of 12-LOX, an essential enzyme required for the production of many SPMs, results in the activation of caspase-7 in

cancer cells (Y. Li, Maher, & Schubert, 1997; Pidgeon, Kandouz, Meram, & Honn, 2002; Wong et al., 2001), showing a mutual inhibitory relationship between 12-LOX and caspase-7. This interaction could be one of the factors that explain why supplementation with ω -3 fatty acids alone is often unable to ameliorate metabolic diseases in humans (Aung et al., 2018; Group et al., 2018). Since, NLRP3 is already activated in the tissues of obese patients, it could prevent the conversion of the ω -3 fatty acids into their anti-inflammatory metabolites.

Inflammasome assembly occurs when a pathogen-associated molecular pattern (PAMP) or a danger-associated molecular pattern (DAMP) activates one of the cell's pattern-recognition receptors (PRR) such as Toll-like receptors (TLRs). While PAMPs are easily defined as pathogen components (LPS for example) being recognised by the host's cells, DAMPs are more complex. DAMPs could be defined as homeostatic abnormalities (extracellular adenosine triphosphate (ATP), abnormally high concentration of glucose or palmitate, oxidized DNA) and out of place cell components (cytoplasmic host DNA) (Broz & Dixit, 2016). In obesity induced by excessive consumption of the western diet, many of these DAMPs are present in the tissues, resulting in PRR activation.

Upon PRR activation, multiple downstream events occur and result in the activation of an inflammasome scaffolding protein. To date, 5 inflammasome scaffolding proteins have been exhaustively studied: NLRP1, NLRP3, NLRC4, AIM2 and Pyrin. Each

scaffolding protein is activated by a specific set of DAMPs and PAMPs and has its own upstream signaling pathway, but they operate almost identically once assembled. Scaffolding proteins initiate the inflammasome assembly by recruiting multiple copies of the adaptor protein apoptosis-associated speck-like protein containing CARD (ASC). ASC then recruits pro-caspase 1 dimers which are cleaved into the mature caspase-1. Caspase-1 then proceeds to activate multiple pro-inflammatory pathways. Since the major difference between inflammasome complexes is the scaffolding protein, the inflammasome complex is named according to its scaffolding protein (Broz & Dixit, 2016). In the context of metabolic diseases, the most pertinent inflammasome complex is probably the NLRP3 inflammasome due to its specific set of activators (Broz & Dixit, 2016).

NLRP3 Priming (Signal 1)

The individual components of the NLRP3 inflammasome are not constitutively expressed. The first step to activate the NLRP3 inflammasome is therefore to activate the transcription and translation of its three major components: the NLRP3 protein, pro-IL-1 β and pro-IL-18 (Bauernfeind et al., 2009). Without this first priming step, the amount of NLRP3 inflammasome protein components in the cell is insufficient to generate a robust downstream signaling cascade (Bauernfeind et al., 2009). TLR ligands such as LPS (Ghonime et al., 2014), cytokines such as TNF- α (Franchi, Eigenbrod, & Nunez, 2009) and IL-1R receptor ligands have been shown to efficiently

prime NLRP3 (see fig.A1a) (Bauernfeind et al., 2009; Y. He, Hara, & Nunez, 2016). The excessive production of reactive oxygen species (ROS) primes the NLRP3 inflammasome (Gros Lambert & Py, 2018). The exact signaling event responsible for this phenomenon is unclear. However, ROS has often been shown to activate NF- κ B through alternative I κ B α phosphorylation (Morgan & Liu, 2011). Oxidative stress that induce the production of ROS, is present in most metabolic diseases such as T2D (J. Wang & Wang, 2017), atherosclerosis (Kattoor, Pothineni, Palagiri, & Mehta, 2017) and NASH (Masarone et al., 2018). This priming, results in NF- κ B activation and the transcription of the NLRP3 protein as well as pro-IL-1 β and pro-IL-18 (Bauernfeind et al., 2009).

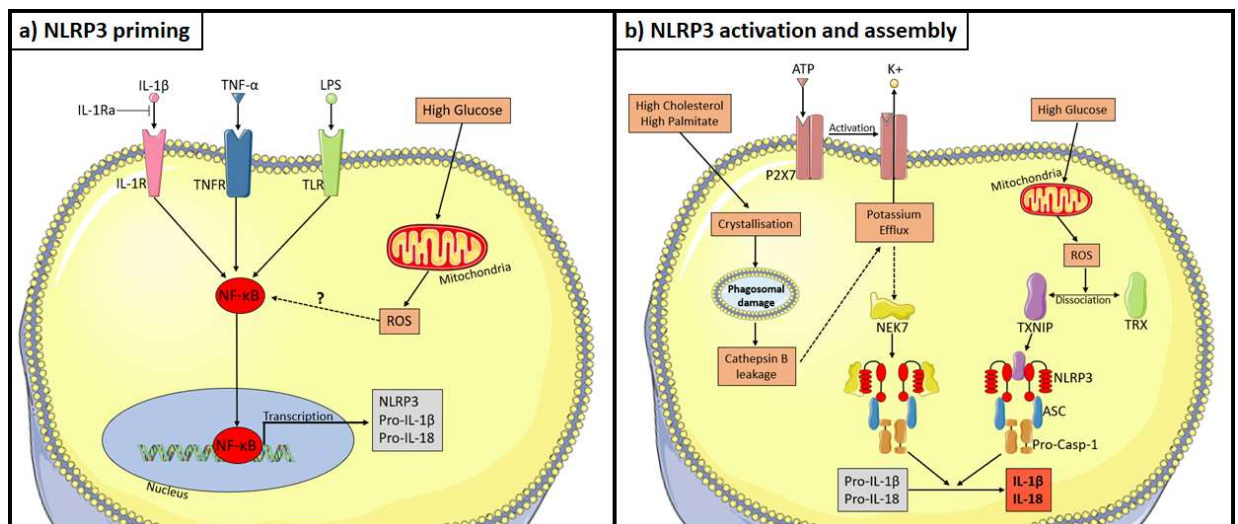


Figure A.1: NLRP3 inflammasome priming and activation. Schematic representation of the principal signal-ing events that modulates the (A) priming and (B) activation of the NLRP3 inflammasome. ASC, apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD; IL-1Ra, interleukin-1 receptor antagonist; NEK7, NimA related

kinase 7; NLRP3, NLR family pyrin domain containing 3; P2X7, purinergic type 2 receptor X7; ROS, reactive oxygen species; TRX, thioredoxin; TXNIP, thioredoxin interacting protein.

NLRP3 Activation (Signal 2)

Multiple stimuli and pathways have been reported to activate NLRP3. Most of these pathways have a common signaling step that includes a potassium efflux from the cell. Consequently, NEK7 is recruited to NLRP3 and assists in its oligomerization (Y. He, Zeng, Yang, Motro, & Nunez, 2016; Schmid-Burgk et al., 2016; H. Shi et al., 2016). Once oligomerization has been achieved, the complex can then proceed to recruit ASC and two pro-caspase-1. The activated caspase-1 can then cleave pro-IL-1 β and pro-IL-18, thus producing the mature form of the cytokines (Broz & Dixit, 2016). High extracellular potassium concentrations or addition of glyburide, an inhibitor of ATP-sensitive potassium channels, prevent the activation of NLRP3 and the release of the pro-inflammatory cytokine IL-1 β (Cullen, Kearney, Clancy, & Martin, 2015).

Multiple PAMPs and DAMPs have been shown to activate NLRP3. Cholesterol crystals that are found in atherosclerotic plaques are recognized as DAMPs. These crystals can be phagocytosed by macrophages which causes lysosomal destabilization and leakage of cathepsin B (Rajamaki et al., 2010) activating NLRP3 (H. Bai et al., 2018) (fig.A1b). Saturated fatty acids can also be identified as DAPMs. Palmitate and stearate, in excess concentration, tend to crystalize in macrophages. This induces

lysosomal dysfunction and downstream signaling that activates NLRP3 and induces IL-1 β release from macrophages. This NLRP3 activation and cytokine secretion is reversed dose dependently by addition of the mono-unsaturated fatty acid oleate. Addition of oleate allows the appropriate storing of saturated fatty acids into triglycerides preventing lipid intracellular crystallization. In theory, the stearoyl CoA desaturase 1 (SCD1) the enzyme responsible for the desaturation of palmitate and stearate could mitigate this issue and alleviate crystal formation and inflammation but failed to do so in one study (Karasawa et al., 2018). SCD1 however as been described as a crucial element in the formation of autophagosomes (Ogasawara et al., 2014) which can degrade inflammasome complexes and components. Additionally, palmitate was shown to activate NLRP3 by causing mitochondrial dysfunction and ROS production (Wen et al., 2011).

Glucose has also been identified as a DAMP. As said before, high glucose concentration can prime NLRP3 via a ROS NF- κ B pathway but it can also activate NLRP3 via a ROS/TXNIP dependent pathway (H. Feng et al., 2016; Hughes & O'Neill, 2018; H. Shi et al., 2015). This means that high glucose could act as both a signal 1 and signal 2 molecule and can trigger inflammation all by itself (H. Feng et al., 2016; Ogasawara et al., 2014).

Finally, exogenous ATP, can also be classified as a DAMP. When released from necrotic cells or secreted by invading neutrophils, it activates NLRP3 by signaling

through the ionotropic P2X7 receptor (Iyer et al., 2009) which then release the intracellular potassium (Gombault, Baron, & Couillin, 2012).

The eicosanoid classes

The induction of the classical features of inflammation are produced in response to the biosynthesis of eicosanoids. In the context of obesity, eicosanoids contribute to the metabolic syndrome in numerous ways such as leukocytes recruitment, cytokine expression, vascular endothelium functions, pre-adipocytes differentiation and pro-lipogenic gene expression.

As previously mentioned, the precursor of eicosanoids is the omega 6 fatty acid ARA. Once produced or after uptake by the cell, free ARA is quickly stored in phospholipids (Brash, 2001). ARA needs to be liberated from phospholipids by a phospholipase to enter the eicosanoid pathways. This is usually carried out by the calcium dependent cPLA₂ enzyme, an important rate-limiting step of eicosanoid production (Gijon & Leslie, 1999). The free ARA can then be transformed further to produce prostanoids, leukotrienes, hydroxyeicosatetraenoic acids (HETEs), endocannabinoids, isoprostanes and lipoxins. The most effective ARA-derived inflammatory modulators are found in the prostanoid, leukotriene and lipoxin families.

The prostanoids

Prostanoids are divided into prostaglandin, prostacyclin and thromboxane subclasses which are synthesized by various pathways. Their precursor ARA is first transformed into prostaglandin G₂ (PGG₂) and then successively to prostaglandin H₂ (PGH₂) by either cyclooxygenase-1 or -2 (COX-1/COX-2) (fig.A2)(Kawahara, Hohjoh, Inazumi, Tsuchiya, & Sugimoto, 2015).

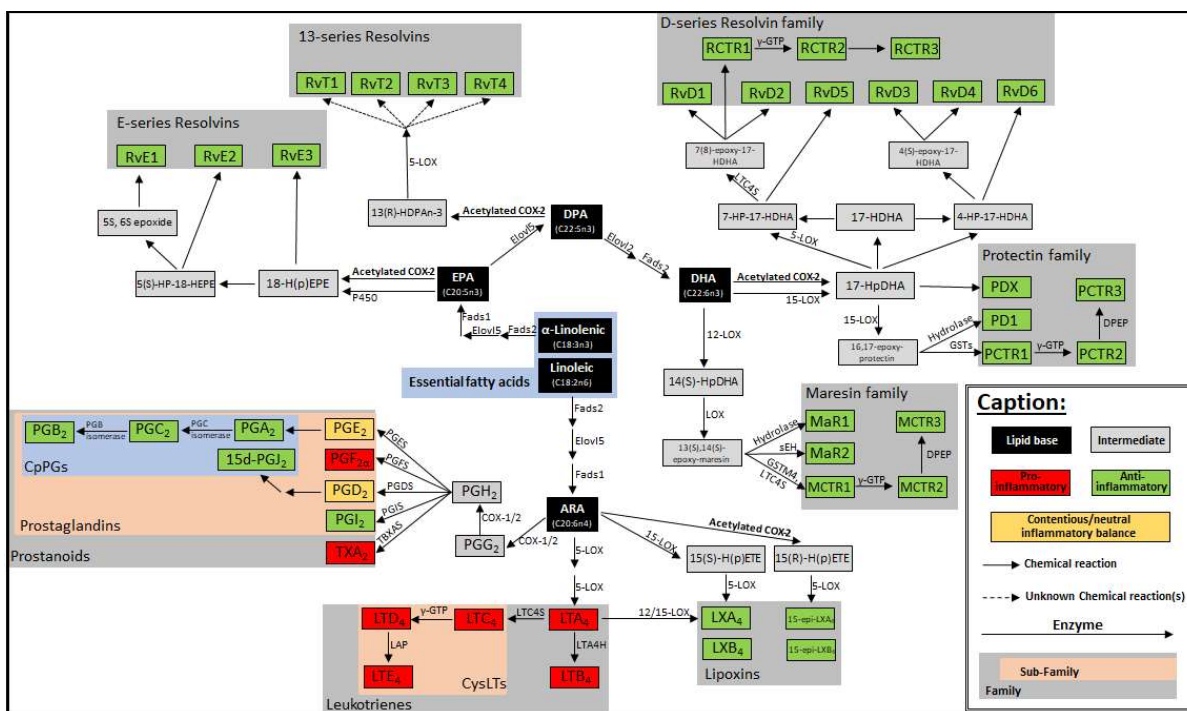


FIGURE A.2 Lipid mediator biosynthetic pathways. Schematic representation of the biosynthetic pathways that produce the eicosanoids and the docosanoids. COX-1 is generally thought to be constitutively expressed while COX-2 expression is highly inducible (de Leval et al., 2000). COX-2 is at the center of many inflammatory pathways that regulates the output of prostanoids in the inflammatory reaction and in

its resorption. Inflammatory cytokines such as IL-1 β and TNF- α have been shown to induce robust COX-2 expression (Dinarello, 2009; Medeiros et al., 2010; Tamura et al., 2002; Zweers et al., 2011) through the NF- κ B and AP-1 transcription factors (Harper & Tyson-Capper, 2008). Since, the expression of the NLRP3 inflammasome component is under the transcriptional regulation of these same transcription factors and because the activation of NLRP3 result in the production of IL-1 β , COX-2 expression is in general parallel to the expression and activation of elements of the NLRP3 signaling pathway. It was also shown that COX-2 greatly amplifies the NLRP3 inflammasome response by producing ROS in response to signal 2 stimulation (ATP) and by inducing the synthesis of PGs (PGE₂) in macrophages (Hua et al., 2015). COX-2 activity is also amplified in response to ROS production creating a positive feedback loop (X. Y. Tian et al., 2012).

While there are dozens of different prostanoid species that can be produced from PGH₂, not all of them are bioactive or able to produce a potent physiological and inflammatory response. The following section will mainly focus on prostanoids having a direct effect on metabolic disorders.

PGE2

Prostaglandin E₂ (PGE₂) is produced from PGH₂ through the action of one of the prostaglandin E synthases: microsomal prostaglandin E synthase-1 and -2 (mPGES-1 and mPGES-2) or the cytosolic prostaglandin E synthase (cPGES). The signaling pathways activated by PGE₂ depends on its concentration as PGE₂ binds to various affinity to its 4 receptors (EP1-4) (Markovic, Jakopin, Dolenc, & Mlinaric-Rascan, 2017). PGE₂ can regulate numerous biological processes including cell proliferation, apoptosis, angiogenesis, and inflammation in multiple cell types. Most importantly, PGE₂ is an important mediator involved in both the initiation and the resolution of inflammation (Nakanishi & Rosenberg, 2013).

PGE₂ act as vasodilators that facilitates the infiltration of leukocytes into the tissue (Nakanishi & Rosenberg, 2013). In macrophages, PGE₂ activates NF-κB. This potentializes the NLRP3 activation and IL-1β secretion (Hua et al., 2015). This also constitute a positive feedback loop that stimulates COX-2 expression. PGE₂ is tough to activate NLRP3 by signaling through modulation of the cAMP production. EP3 activation has been shown to reduce cyclic adenosine monophosphate (cAMP) production. Since cAMP is able to bind directly to NLRP3 and prevent its activation (G. S. Lee et al., 2012) the activation of the EP3 receptor leads to the downregulation of cAMP facilitating NLRP3 activation (Kalinski, 2012; Sugimoto et al., 1992). On the other hand, activation of EP2 and EP4 stimulates the formation of cAMP (Kalinski, 2012; Markovic et al., 2017) producing anti-inflammatory effects. Signaling through

EP4 has been linked to reduced NF- κ B activation and reduced secretion of pro-inflammatory cytokines [35, 40].

In a normal inflammatory reaction, the end of the initiation phase of inflammation is characterised by a peak in PGE₂ concentration. This is followed by a marked increase in lipoxin A₄ (LXA₄) (anti-inflammatory) secretion and the reduction in leukotriene B₄ (LTB₄) (pro-inflammatory) secretion. This shift in LXA₄ and LTB₄ synthesis induces a sudden reduction in the neutrophil population and inflammatory cytokines production (Levy et al., 2001). This is explained by the fact that high concentrations of PGE₂ inactivates 5-LOX and activates 15-LOX, the enzymes responsible for the synthesis of LTB₄ and LXA₄ respectively. Thus, high concentrations of PGE₂ diverts ARA utilization away from the leukotriene pathway toward the lipoxin pathway (Levy et al., 2001).

PGE₂ also modulates the metabolism through its effect on adipocyte differentiation. The EP3 receptor is abundantly expressed in the white adipose tissue (WAT). Its expression is decreased in the WAT of hyperphagic db/db mice and in mice fed with a high fat diet (HFD). Silencing EP3 also produces an obese phenotype associated with increased food intake, reduced insulin sensitivity, elevated serum triglycerides (Xu et al., 2016) as well as increased macrophage infiltration and inflammation (Ceddia et al., 2016). This is probably because PGE₂ decreases peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) expression in adipocytes. PPAR γ activation orientate the

pre-adipocyte differentiation toward a white phenotype. The PGE₂ mediated inhibition of PPAR γ instead orients the differentiation toward a beige phenotype. This is associated to increased expression of the uncoupling protein 1 (UCP1) and energy expenditure (Garcia-Alonso et al., 2013). PGE₂ treatment of human white adipose tissue explants and differentiated 3T3 adipocytes also reduces the expression of fibrogenic and inflammatory genes including IL-6 and monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) (Garcia-Alonso et al., 2016).

While PGE₂ seems to produce beneficial effects in adipose tissue, its role in the liver appears more ambiguous. PGE₂ biosynthesis is increased in the liver of obese patients (J. Henkel et al., 2018). The induction of COX-2 and PGES (mPGES1 and mPGES2), responsible for the production of PGE₂, in mouse primary hepatocytes enhances *de novo* lipogenesis while reducing β -oxydation and lipoprotein secretion (J. Henkel et al., 2012). PGE₂ also dose dependently increases glucose output in rat hepatocytes thus representing an aggravating factor in hyperglycemia (Mine, Kojima, & Ogata, 1990). However, mPGES silencing, in a mice model of NASH, increases the secretion of IL-1 β and TNF- α as well as tissue damage (J. Henkel et al., 2018). In addition, it was showed that COX-2 and mPGES1 expression are both elevated in renal diseases. PGE₂ signaling through EP1, EP3 act as vasoconstrictors that induce hypertensive effects which contributes to renal insufficiency and injury leading to increased cardiovascular risk (Nasrallah, Hassouneh, & Hebert, 2016).

TXA₂

Thromboxane A₂ (TXA₂) induces multiple physiological responses, including platelet cells adhesion and aggregation, vascular smooth muscle cell contraction and endothelial inflammatory responses (Nakahata, 2008). Additionally, TXA₂ induces monocytes and T lymphocytes recruitment through activation of NF-κB and activator protein 1 (AP1) which results in production of MCP-1, a potent chemoattractant that recruit leukocytes (Ishizuka, Sawada, Sugama, & Kurita, 2000).

One of the greatest physiological challenges that the body experiences in obesity is the proper irrigation of the growing adipose tissue. The angiogenesis process is therefore insufficient, and a hypoxic milieu is created in the tissue. This dysregulates secretory functions promoting inflammation in local blood vessels and the secretion of the vasoconstrictive TXA₂. Dysfunctional endothelial cells imbedded in adipose tissue express high level of COX-2. This overexpression results in the overproduction of TXA₂ resulting in excessive vasoconstriction mediated by the vascular smooth muscle cells (Akamine et al., 2006; Lobato et al., 2011; Lobato et al., 2012). High glucose concentration is also a factor that elevates the expression of COX-2 in endothelial (Cosentino et al., 2003) and smooth muscle cells (Y. Shi & Vanhoutte, 2008), thus promoting hypertension in T2D.

TXA₂ have also an important role in the development of preeclampsia observed in obese women. The usual treatment for preeclampsia is a daily dose of aspirin. At low dose (between 60 and 150mg/day), aspirin induces the acetylation of the COX enzymes. Acetylation of COX-1 results in lower production of TXA₂ decreasing the risk of preeclampsia. However, obese women still produce more TXA₂ than lean women even when medicated suggesting that aspirin resistance may occur in obese patients (Finneran, Gonzalez-Brown, Smith, Landon, & Rood, 2019).

BOX-1

Aspirin covalently modify COX enzymes by acetylating SER-530 within the enzymes active site. This covalent modification leads to complete irreversible loss of COX-1 activity. On COX-2 however, the acetylation results in a shift of reaction specificity. This shift converts COX-2 into a lipoygenase (Lucido, Orlando, Vecchio, & Malkowski, 2016). Therefore, COX-2 acetylation results in a blockage of prostanoid production in favor of the production of precursors for anti-inflammatory compounds such as 15R-HETE (precursor of 15-epi-Lipoxins) and 17-HpDHA (precursor of protectins and resolvins)(fig.A2) (Lucido et al., 2016; N. P. Sharma, Dong, Yuan, Noon, & Smith, 2010).

BOX-1

PGF_{2α}

Prostaglandin F_{2α} (PGF_{2α}) has hypertensive, as well as pro-inflammatory properties. PGF_{2α} is overproduced in renovascular hypertension in response to increased oxidative stress. This leads to reduced renal blood flow, aggravation of renal damage and increased mean arterial pressure (X. Y. Tian et al., 2012). Similarly, PGF_{2α} contributes to endothelial dysfunction and hypertension in T2D (Vessieres et al., 2013). PGF_{2α} also

represses the progression of the early stage of adipogenesis by increasing intracellular calcium concentrations through activation of a calcium/calmodulin-dependent protein kinase (CaMK) (C. W. Miller, Casimir, & Ntambi, 1996).

PGI₂

Prostaglandin I₂ (PGI₂), synthesised by the prostaglandin I Synthase (PGIS), is primarily produced in the vasculature, particularly in pulmonary arterial segments (Dorris & Peebles, 2012; El-Haroun et al., 2008). In the cardiovascular system it induces vasodilatation and inhibit platelet aggregation (Armstrong et al., 1977; Kelton & Blajchman, 1980; Kobzar, Mardla, Jarving, & Samel, 2001; S. B. Miller, 2006). PGI₂ directly inhibits the vasoconstrictive and pro-aggregating functions of TXA₂ (Majerus, 1983; Mohite, Chillar, So, Cervantes, & Ruan, 2011; Moncada, Herman, Higgs, & Vane, 1977). The insufficient synthesis of PGI₂ is associated to hypertension in obese individuals (Lobato et al., 2012).

It was also discovered that PGI₂ can modulate the expression of specific miRNAs. A study by Mohite A. *et al.* used a hybrid enzyme composed of both COX-1 and PGIS linked by a 10-amino acid linker. The resulting enzyme had a triple catalytic function, converting ARA into PGG₂, then into PGH₂ and finally into PGI₂ in quick succession. The expression of this enzyme into mouse mature adipocytes successfully diverted ARA away from PGE₂ to PGI₂ synthesis. This results in the differential expression of

various miRNAs (Mohite et al., 2011). One of the most upregulated miRNAs, miR-711 (targeting CCAAT/C/EBP β and RAC-alpha serine/threonine-protein kinase (Akt1)) reduces adipocyte differentiation probably via a PPAR γ -dependent mechanism. In fact, it was previously demonstrated that PGI₂ is able to directly activate PPAR β/δ (Bishop-Bailey & Wray, 2003) and indirectly activate PPAR γ by first activating the prostaglandin I₂ receptor (IP) (Falcetti et al., 2007).

PGD₂

Prostaglandin D₂ (PGD₂) is known to produce either pro- or anti-inflammatory effects depending on the context. PGD₂ is produced during allergic lung inflammation where it induces inflammation (M. L. Moore & Peebles, 2006). However, PGD₂ production by Kupffer cells (liver resident macrophages) helps to maintain an anti-inflammatory environment in the liver (Fujita & Narumiya, 2016).

PGD₂ can be produced by either the lipocalin-type prostaglandin D synthase (L-PGDS) or the hematopoietic prostaglandin D synthase (HPGDS). High-fat diet (HFD) selectively induces the expression of L-PGDS in the adipose tissue, increasing the production of PGD₂ and stimulating the progression of adipogenesis (Fujimori, Aritake,

& Urade, 2007). However, most of the PGD_2 produced in the white adipose tissue is synthesised in macrophages, using HPGDS. Thus, PGD_2 not only stimulate the production of adipocytes but polarise their resident macrophages toward the M2 anti-inflammatory state (Virtue et al., 2015). As PGI_2 , PGD_2 activate adipogenesis via $\text{PPAR}\gamma$ (Forman et al., 1995; Fujimori, Maruyama, Kamauchi, & Urade, 2012; Kliewer et al., 1995). Similarly, another study showed that $\text{PTGDS}^{-/-}$ mice (the gene encoding L-PGDS) have increased insulin resistance and reduced glucose tolerance under HFD developing a more severe T2D than WT mice. Absence of L-PGDS expression also results in larger adipocytes, even in mice fed a low-fat diet (Ragolia et al., 2005). *PTGDS* expression is also positively correlated with higher brown adipose tissue activity and PPARs activation (γ , 1α and 1β). Upon cold-acclimation $\text{PTGDS}^{-/-}$ mice rely more on carbohydrate to fuel thermogenesis than WT mice (Virtue et al., 2012). The increased usage of glucose resulted in a better outcome in glucose tolerance test in $\text{PTGDS}^{-/-}$ mice. However, *PTGDS* knockdown had no effect on insulin levels explaining why under normal temperature conditions, $\text{PTGDS}^{-/-}$ mice also develop T2D when fed with HFD (Virtue et al., 2012). Interestingly, the specific knockdown of *PTGDS* in adipocytes also results in improved metabolic health when mice are fed with HFD. This is characterized by reduced body weight, increased glucose tolerance and insulin sensitivity as well as reduced macrophages M1 inflammatory markers in the adipose tissue (Fujimori et al., 2019).

15d-PGJ₂

15-Deoxy-Delta-12-14-prostaglandin J₂ (15d-PGJ₂), a non enzymatic derivative of PGD₂, is strictly an anti-inflammatory metabolite. 15d-PGJ₂ acts through multiple pathways to inhibit inflammation. First, it acts directly on NF-κB by reducing its transcriptional activity (Remels et al., 2009; Daniel S. Straus et al., 2000; Suh et al., 2018). Additionally, 15d-PGJ₂ is a potent activator of PPARγ that in turn further inhibits the transcriptional activity of NF-κB's (Remels et al., 2009). The direct inhibitory effect of 15d-PGJ₂ on NF-κB is possible because of its particular chemical structure (Talalay, De Long, & Prochaska, 1988). 15d-PGJ₂ inhibit NF-κB DNA-binding capacity by alkylating its nuclear factor NF-kappa-B p65 subunit (RelA/p65) (Villagomez, Hatti-Kaul, Sterner, Almanza, & Linares-Pasten, 2015; Widen et al., 2018), p50 subunits (Nguyen et al., 2015) or IKKα/β, the upstream activators of NF-κB (Dong et al., 2015).

PGA₂

Prostaglandin A₂ (PGA₂) is the product of a non-enzymatic dehydration within the cyclopentane ring of PGE₂ (Straus & Glass, 2001). Despite very few studies available,

PGA₂ appears to have mostly anti-inflammatory properties. PGA₂ suppresses LPS-induced inflammation in pulmonary endothelial cells, microglia and astrocytes by inhibiting NF-κB signaling (Ohmura et al., 2017; Storer, Xu, Chavis, & Drew, 2005). Like 15d-PGJ₂, PGA₂ is a cyclopentenone prostaglandin (CpPG) which inhibits NF-κB signaling in the same manner (Rossi et al., 2000; Straus & Glass, 2001). Interestingly, EP4 has been identified as a receptor of PGA₂ (Ohmura et al., 2017). This means that some of the anti-inflammatory properties of PGE₂ could be attributable to PGA₂ after a spontaneous transformation of PGE₂ to PGA₂ (Thurnher et al., 2005).

Other effects of PGA₂ include its capacity to act as a redox signal that modulates the metabolism in atherosclerosis. PGA₂, as well as its derivatives PGC₂ and PGB₂ have potent inhibitory effects on the cholesterol metabolism of inflammatory macrophages. In macrophages, PGA₂ inhibits lipogenesis and deviates acetyl-CoA units from cholesterologenesis to phospholipids production. Thus, PGA₂, when delivered *in vivo* inside liposomes, dramatically reduces cholesterol accumulation in foam cell and atherosclerosis lesions (Gutierrez, Maslinkiewicz, Curi, & de Bittencourt, 2008; Homem de Bittencourt et al., 2007). Interestingly, PGA₂ has also been reported to activate all three PPARs (γ , α and β) suggesting again anti-inflammatory properties (Corton, Anderson, & Stauber, 2000).

Leukotrienes

Leukotrienes are strictly pro-inflammatory molecules. Leukotriene A₄ (LTA₄) is first produced by the transformation of ARA by the 5-Lipoxygenase enzyme (5-LOX). Then, LTA₄ is either transformed into LTB₄ by leukotriene A₄ hydrolase or into LTC₄ by leukotriene C₄ synthase (fig.2) (Murphy & Gijon, 2007).

The main characteristic of LTB₄ is its potent chemotactic effect on leukocytes (Yokomizo, Nakamura, & Shimizu, 2018). In response to HFD, LTB₄ production is increases in the liver, muscles and adipose tissues. Silencing the LTB₄ receptor BLT₁, induces an anti-inflammatory phenotype and rescues insulin sensitivity in HFD-fed mice (P. Li et al., 2015). In opposition, LTB₄ treatment in primary hepatocytes activates *de novo* lipogenesis and gluconeogenesis in addition to impairing insulin-mediated suppression of hepatic glucose output (P. Li et al., 2015).

Lipoxins

Lipoxins are an anti-inflammatory eicosanoid family produced from ARA and are potent inhibitors of neutrophil recruitment (Levy et al., 2001). Their biosynthesis can occur through two different pathways. The lipoxygenation of ARA by 15-LOX results in the formation of 15(S)-H(p)ETE while the lipoxygenation of ARA by acetylated COX-2 or P450 results in the formation of 15(R)-H(p)ETE. Following this, a second lipoxygenation of these products by 5-LOX result in the production of lipoxins (LXA₄

and LXB₄) and their epi-lipoxin counterparts (15-epi-LXA₄ and 15-epi-LXB₄ (fig.A2). LXA₄ can be also synthesized by lipoxygenation of LTA₄ by either 12-LOX or 15-LOX.

In obese mice, periodic intraperitoneal injection of LXA₄ attenuates hepatic steatosis and chronic-kidney-disease. LXA₄ injection also reduced obesity-induced inflammation by reducing the secretion of TNF- α and shifting the polarization of adipose tissue macrophages toward the M2 polarization. (Borgeson et al., 2015). The effect of LXA₄ on renal morphology and function is probably the result of inhibition of NF- κ B and ERK/p38 MAPK signaling (Guo, Jiang, Jiang, Tian, & Li, 2018).

THE DOCOSANOIDS

The specialized pro-resolving mediators (SPMs)

Much of the anti-inflammatory and tissue regenerative properties attributed to ω -3 fatty acids may in fact be attributable to their metabolites, the maresins, protectins, resolvins but also to their respective conjugates Maresin Conjugates in Tissue Regeneration (MCTRs), Protectin Conjugates in Tissue Regeneration (PCTRs) as well as Resolvin Conjugates in Tissue Regeneration (RCTRs) (Dalli & Serhan, 2018). Together, these lipid mediators have been coined as specialised pro-resolving mediators (SPMs). In

addition to the ω -3 derived lipid mediators, the ω -6 derived lipoxins are also recognized as members of the SPM superfamily (Dalli & Serhan, 2018). SPMs have a particularly potent anti-inflammatory effect even at nanomolar concentrations. They serve as agonists for specific G protein-coupled receptors (GPCRs).

Maresins and MCTRs

Maresins, also known as macrophage mediators in resolving inflammation, were initially discovered in macrophages (Serhan et al., 2009). MaR1, MaR2 and their sulfide-conjugate MCTR1 are produced from the 13S,14S-epoxide-maresin intermediate. 13S,14S-epoxide-maresin is first obtained from DHA via two consecutive lipoxygenations (fig.A2) (Dalli & Serhan, 2017; Dalli et al., 2016; Dalli et al., 2013; Deng et al., 2014; Serhan & Levy, 2018; S. Tang, Wan, Huang, Stanton, & Xu, 2018).

Maresins are known to inhibit the recruitment of polymorphonuclear cells and increasing the macrophage efferocytosis, the phagocytosis of dying cells. Maresins block NF- κ B activation (Akagi, Chen, Toy, Chatterjee, & Conte, 2015) and downregulate many pro-inflammatory cytokines such as TNF- α , IL-1 β and IL-6. It also reduces the production of prostanoids and leukotrienes (Serhan, 2017; Spite, Claria, & Serhan, 2014; S. Tang et al., 2018). Finally, MaR1 was showed to improve the insulin

sensitivity of *ob/ob* obese mice and to stimulate the M2 polarization of macrophages (Martinez-Fernandez et al., 2017).

Protectins and PCTRs

Protectins and their sulfide-conjugates (PCTRs) are produced from the 17-HpDHA intermediate, a molecule obtained from the transformation of DHA by 15-LOX or acetylated COX-2 after aspirin treatment (Gonzalez-Periz et al., 2006). In a mouse model of carbon tetra chloride (a potent environmental toxin)-induced liver injury, supplementation of the diet with DHA induced the production of protectin D1 (PD1) and 17-HpDHA (Gonzalez-Periz et al., 2006). The combined effect of PD1 and 17-HDHA (reduced form of 17-HpDHA), greatly reduced liver injury in part via activation of PPAR γ . This was also associated with a reduced 5-LOX activity, a reduced COX-2 expression and a lower secretion of TNF- α (Gonzalez-Periz et al., 2006). Protectin X (PDX) also displays liver protective effects (White et al., 2014). Jugular infusions with intralipid emulsions in mice results in rapid systemic inflammation and reduction of insulin sensitivity. However, the addition of PDX in the lipid infusion prevent the secretion of pro-inflammatory cytokines, rescues insulin signaling, and increases the plasma concentration of the cytokine IL-6 (White et al., 2014) that has in this context, anti-inflammatory properties (Scheller, Chalaris, Schmidt-Arras, & Rose-John, 2011). In the same study, the authors showed that the PDX insulin sensitization effects in skeletal muscle are abrogated by IL-6 silencing. This indicates that PDX acts through

induction of skeletal muscle IL-6 production to modulate glucose metabolism (White et al., 2014). In skeletal muscles, IL-6 also increases glucose uptake as well as glycogen synthesis (Belizario, Fontes-Oliveira, Borges, Kashiabara, & Vannier, 2016; Weigert, Hennige, Brodbeck, Haring, & Schleicher, 2005).

Resolvins and RCTRs

The production of resolvins and their sulfide-conjugates (RCTRs) is far more complex than their maresin and protectin counterparts because multiple distinct series of resolvins exist. The E-series is produced from the transformation EPA into the intermediate 18-H(p)EPE by P450 or the acetylated form of COX-2 while the 13-series are produced from the 13(R)-HDPAn-3 intermediate formed by the conversion of DPA using the acetylated form of COX-2. Finally, the D-series of resolvins (RvDs) as well as the RCTRs are produced from the intermediate 17-HpDHA, which is also the precursor of the protectins (Dalli, Ramon, Norris, Colas, & Serhan, 2015; Serhan & Levy, 2018) (fig.A2).

In a murine model of non resolving lung inflammation, RvD1 reduces the expression of pro-inflammatory cytokines (Chemokine (C-C motif) ligand 5 (CCL5), C-X-C motif chemokine ligand 1 (CXCL1), C-X-C motif chemokine ligand 10 (CXCL10), IL-1 β , IL-17) (Codagnone et al., 2018). This was linked to an increased expression of miR-155 and miR-21 known to target Pattern Recognition Receptors (PRR) such as TLRs

as well as targeting the NF- κ B transcription factor (Codagnone et al., 2018). RvD1 also up-regulates miR-146b and miR-219 that target NF- κ B signaling and 5-LOX respectively (Recchiuti, Krishnamoorthy, Fredman, Chiang, & Serhan, 2011). RvD1 can thus interfere with the production of prostaglandins and leukotrienes. It can also limit the expression of proteins dependent on NF- κ B such as NLRP3 and many pro-inflammatory cytokines (Croasdell, Sime, & Phipps, 2016).

ROLE OF LIPID INFLAMMATORY MEDIATORS IN METABOLIC DISEASES.

Docosanoids functions are specifically anti-inflammatory and often overlaps in their functions. The traditional approach to inflammatory treatment has been the inhibition of the formation of eicosanoids that display inflammatory properties. However, non-specific inhibition of eicosanoid production can lead to undesired consequences (gastrointestinal complications for example) (Singh & Triadafilopoulos, 1999) because the eicosanoid class has mediators that modulate both pro- and anti-inflammatory effects as well as having important homeostatic functions (see above). Thus, stimulating the production of docosanoid SPMs instead of inhibiting the synthesis of eicosanoids appears to be a promising approach to treat inflammation in metabolic disease.

Lipid mediators in atherosclerosis

High fat feeding of ApoE^{-/-} mice (a mice model of atherosclerosis) leads to the rapid development of atherosclerosis. Under those conditions, the circulating concentrations of eicosanoids (PGE₂, PGD₂, LTB₄) increases while the concentrations of RvD2 and MaR1 decreases (Viola et al., 2016). This shift toward the accumulation of eicosanoids correlates with the elevation of plaque instability markers, including the expansion of the necrotic core, the accumulation of macrophages, the reduction of the fibrous cap's thickness and the reduction in the number of smooth muscle cell. Interestingly, injection of mice with RvD2 and MaR1 prevents atheroprogession and promote M2 pro-resolving polarization of macrophages (Viola et al., 2016).

NLRP3 and IL-1 β are also thought to be important in the progression of atherosclerosis. Cholesterol deposition occur early in the formation of the atherosclerotic lesion and result in the formation of cholesterol crystals that can activate NLRP3 in invading macrophages/monocytes (Karasawa & Takahashi, 2017). Autophagy is able to inhibit NLRP3 activation either by directly targeting NLRP3 and its complex for degradation in autophagosomes (C. S. Shi et al., 2012) or indirectly by mitophagy which eliminates dysfunctional mitochondria and limit their ROS production (Zhou, Yazdi, Menu, & Tschopp, 2011). Autophagy-defective *atg5*^{-/-} mice have higher levels of NLRP3 activation and develop atherosclerosis at a higher rate (Razani et al., 2012). Berberine, isolated from the pant *Berberis vulgaris*, increases the autophagic flux of cells (H. Sun

et al., 2018) and limits the protein expression of NLRP3 components (Vivoli et al., 2016). In ApoE^{-/-} mice under HFD, oral administration of berberine significantly reduces the serum levels of pro-inflammatory cytokines and atherosclerosis markers (Wan, Liu, Yang, & Cui, 2018). A specific NLRP3 inhibitor, IFM-2427, is presently in clinical trials and could be soon available for treatment of atherosclerotic patients (Mullard, 2019).

Lipid mediators in non-alcoholic steatohepatitis (NASH)

Western diet feeding often induces hepatic steatosis characterized by lipotoxicity, overproduction of ROS and inflammation. It is also associated with activation of pro-lipogenic pathways and accelerated lipid accumulation. This condition, known as nonalcoholic steatohepatitis (NASH), can then lead to fibrosis, cirrhosis and the development of hepatocellular carcinomas. NASH also contributes to insulin resistance and hyperglycemia (Y. H. Han et al., 2019). *Omega-3 fatty acid desaturase fat-1 (fat-1)* is a gene found in *C. Elegans*, that transcribed a n3 desaturase capable of transforming ω -6 into ω -3 fatty acids. The *fat-1* transgenic mice thus have a high ω -3/ ω -6 ratio in their tissues (Kang, 2007). Mice fed with DHA and *fat-1* mice present a higher M2 polarization of liver macrophages and resorbs inflammation compared to their respective controls (Y. H. Han et al., 2019). This effect was largely mediated through the activation of the RAR-related orphan receptor alpha (ROR α) transcription factor by the maresin MaR1. In this study, the authors discovered a signaling loop in

which DHA is converted to MaR1 by 12-LOX (and other enzymes, see fig.A2) which then activates ROR α (Y. H. Han et al., 2019). ROR α then proceeds to activate the transcription of *Alox-12* (the gene transcribing 12-LOX), *Rora* (the gene transcribing ROR α) and *klf4*. The newly produced Krüppel-like factor 4 (KLF4) transcription factors then mediates the polarization shift of macrophages toward M2. The increased expression of 12-LOX also results in a positive feedback loop increasing MaR1 production and activation of ROR α . Unsurprisingly, a daily MaR1 intra-peritoneal injection result in the complete abolition of all symptoms associated to NASH (Y. H. Han et al., 2019). 12-LOX expressions is reduced in human hepatic biopsies (Y. H. Han et al., 2019). As 12-LOX is an important enzyme that enables the production of lipoxins, maresins and resolvins, its reduced expression is likely to play a key role in the failed resolution of inflammation characterizing NASH.

NLRP3 expression and activation is also enhanced in NASH exacerbating liver damage, lipid accumulation and insulin resistance. In a mice model where NASH is induced by a methionine- and choline-deficient diet, intraperitoneal administration of berberine, which increases the autophagic flux of cells (H. Sun et al., 2018), limits NLRP3 expression and IL-1 β secretion. Consequently, mice survival is increased, and the NASH symptoms attenuated (Vivoli et al., 2016). These results were replicated by using MCC950, a NLRP3 selective inhibitor, in hyperphagic *foz/foz* mice fed methionine/choline deficient diet. MCC950 was able to block the activation of caspase-

1, the maturation of IL-1 β and greatly alleviate liver fibrosis but not lipid accumulation (Mridha et al., 2017). This suggests that MCC950 treatments blocked the transition of hepatic steatosis towards NASH.

Lipid mediators in the type 2 diabetes

One of the key contributing factors of peripheral insulin resistance is adipose tissue inflammation associated with high production of pro-inflammatory cytokines (IL-6, TNF- α and MCP-1). These cytokines can then leak from the white adipose tissue, enter the circulation and reach other organs interfering with their insulin sensitivity. A daily MaR1 intraperitoneal injection in obese overfed *ob/ob* mice successfully reverses white adipose tissue inflammation and promotes the M2 polarization of macrophages in the tissue. MaR1 treatment also reduces the expression of pro-inflammatory genes in the white adipose tissue and improved their insulin sensitivity (Martinez-Fernandez et al., 2017).

The role of NLRP3 in T2D came from its effect in pancreatic β -cells. In fact, NLRP3 dependent maturation of IL-1 β has a crucial role in β -cells death (Youm et al., 2011; Zhao, Dharmadhikari, Maedler, & Meyer-Hermann, 2014). Human pancreatic islets secrete IL-1 β in response to high glucose concentrations. IL-1 β then activates inflammatory pathways by signaling through its receptor IL-1R, resulting in the recruitment of immune cells (mainly macrophages) into the islets. This state of chronic

inflammation eventually leads to tissue damage and islets dysfunction. Pancreatic islet also secrete interleukin-1 receptors antagonists (IL-1Ra) to block IL-1 β signaling. However, in prolonged exposure to high glucose this compensatory mechanism is insufficient to block IL-1 β signaling efficiently (Herder, Dalmas, Boni-Schnetzler, & Donath, 2015).

In *ex vivo* human pancreatic islets, hypoxia or LPS+ATP activates NLRP3 expression, resulting in β -cell death. This death is inhibited by glyburide, an NLRP3 inhibitor (Lebreton et al., 2018). Similar observations were made in mice where genetic silencing of NLRP3 shows protection of the pancreatic islets against T2D induced by either oxidative stress (Sokolova et al., 2018) or HFD (Youm et al., 2011). NLRP3^{-/-} mice have reduced macrophage infiltration in the islets, reduced β -cell death and improved glucose homeostasis (Sokolova et al., 2018).

Lipid mediators in Nonhealing diabetic wounds

Diabetic patients often suffer from delayed inflammatory resolution as well as delayed wound healing (Pierce, 2001). The initiation of the inflammatory reaction as well as its resorption must occur properly for the wound to heal. In diabetic patients, the reparative functions of macrophages are impaired, leading to an increase in the apoptotic cell burden in the wound (Khanna et al., 2010) as well as a reduction of vascular endothelial growth factor and platelet-derived growth factor secretion (H. Tian, Lu, Shah, & Hong,

2011). Using a murine splinted excisional wound healing model, it was determined that a DHA metabolite (14S,21R-diHDHA) is underproduced in the macrophages of diabetic *db/db* mice. However, a single treatment with 14S,21R-diHDHA was sufficient to restore macrophage wound healing capabilities (H. Tian et al., 2011). Similarly, 14,22-diHDHA, also named the Maresin-like MaR-L, is also able to rescue macrophage wound healing functions in *in vitro* experiments (Hong et al., 2014).

NLRP3, caspase-1, and IL-1 β are overexpressed in the wounds of diabetic patients compared to non-diabetic controls. The increased expression of NLRP3 highly co-localise with the macrophage marker CD68, indicating that macrophages are mostly responsible for this phenomenon (X. Zhang, Dai, Li, Chen, & Chai, 2017). *In vitro* cultures of macrophages with glucose concentrations similar to those found in the diabetic patients (30 mM) induce high expression of NLRP3, caspase-1, and IL-1 β compared to macrophages exposed to normal levels of glucose (5.5 mM) (X. Zhang et al., 2017). Furthermore, the selective silencing of NLRP3 in the bone marrow of diabetic mice and the topical application of pharmacological inhibitors of NLRP3 (glyburide) and caspase-1 (YVAD) are both able to improve diabetic wound healing efficiency (Mirza, Fang, Weinheimer-Haus, Ennis, & Koh, 2014).

Lipids mediators in Diabetic nephropathy

Another comorbidity of T2D is the diabetic nephropathy characterised by the formation of glomerular mesangial lesions and the increased synthesis of extracellular matrix that leads to glomerular sclerosis and interstitial fibrosis. The cause of the disease is thought to be inflammatory in nature. Continuous hyperglycemia leads to the overproduction of ROS in the renal tissues, leading to the activation of NLRP3, inflammatory signaling, and consequently disease progression (C. Wang, Pan, Zhang, Wang, & Kong, 2012). Interestingly, *ex vivo* treatment of mouse glomerular mesangial cells with MaR1 inhibits the production of ROS, the activation of NLRP3 and the expression of pro-inflammatory cytokines (IL-1 β , Transforming growth factor beta 1 (TGF- β 1)), thus limiting glomerular inflammation and the early fibrosis (S. Tang et al., 2017). The genetic deletion of NLRP3 in mice attenuates the tubular injuries, the inflammation as well as the fibrosis, partially restoring kidneys function. This is associated with a decrease in ROS formation and with the inhibition of TXNIP expression, a potent oxidative stress inducer (Wu et al., 2018).

CONCLUSION

The lipid mediators and NLRP3 are key modulators of inflammation. The activation or inhibition of their respective pathways is what allows the progression of obesity's comorbidities. Therefore, it cannot be stressed enough how much the composition of

the western diet is deleterious. The low proportion of ω -3 compared to ω -6 fatty acids promotes the production of prostanoids and leukotrienes and reduce the production of SPMs, a phenomenon that promote a pro-inflammatory environment limiting the capacity for inflammation resorption. Additionally, many components of the western diet (high concentration of palmitate, cholesterol and glucose) also promote the priming and the activation of the NLRP3 inflammasome. This second ‘hit’ further promote inflammation by recruiting leukocytes in the tissue, but also by limiting even further the production of SPMs. These two ‘hits’ promote and also accelerate the development of atherosclerosis, NASH, T2D, nonhealing diabetic wounds and diabetic nephropathy.

Fortunately, the comprehension of inflammation initiation and resolution has dramatically evolved in the last decade. The discovery of SPM and inflammasomes as well as the elucidation of their roles in metabolic diseases has given us a way to target inflammation in a new and more efficient way. The ancient approach of inhibiting the synthesis of eicosanoids by using nonsteroidal anti-inflammatory drugs has shown some results in the fight against obesity-derived inflammation and obesity’s comorbidities. However, it is apparent that this approach has its limits. Future approaches to treat these inflammatory driven diseases will have to target pathways that can trigger inflammatory resorption instead of just limiting the synthesis of pro-inflammatory mediators. Since NLRP3 activation blocks the production of essential

pro-resolving SPMs, the combination of diet enriched in ω -3 fatty acids combined with NLRP3 inhibitor treatment could have synergic effects in promoting the resolution of inflammation in the tissues of obese individuals.

The limitation of the direct use of SPMs is the requirement of daily injections. Since SPMs exerts their effect partly via activation of GPCRs, pharmacological agonists could be developed for these receptors and administered orally to mimic the effects of the SPMs. Such drugs may have the potential to become the best method of treating chronic inflammation. Only a handful of receptors have been identified for the SPMs. The discovery of new receptors could give us more targets to develop anti-inflammatory drugs.

ANNEXE B

APOLIPOPROTÉINE D

APOLIPOPTEIN D

Eric Rassart, **Frederik Desmarais**, Ouafa Najyb, Karl-F. Bergeron, Catherine Mounier

Gene. 2020 September 25, 756: 144874

Keywords

Apolipoprotein D; Lipocalin; Lipid transport; Lipid metabolism; Arachidonic acid; Neuroprotection

Abstract

ApoD is a 25 to 30 kDa glycosylated protein, member of the lipocalin superfamily. As a transporter of several small hydrophobic molecules, its known biological functions are mostly associated to lipid metabolism and neuroprotection.

ApoD is a multi-ligand, multi-function protein that is involved lipid trafficking, food intake, inflammation, antioxidative response and development and in different types of cancers.

An important aspect of ApoD's role in lipid metabolism appears to involve the transport of arachidonic acid and the modulation of eicosanoid production and delivery in metabolic tissues. ApoD expression in metabolic tissues has been associated positively and negatively with insulin sensitivity and glucose homeostasis in a tissue dependent manner.

ApoD levels rise considerably in association with aging and neuropathologies such as Alzheimer's disease, stroke, meningoencephalitis, moto-neuron disease, multiple sclerosis, schizophrenia and Parkinson's disease. ApoD is also modulated in several animal models of nervous system injury/pathology.

Introduction and characteristics of apolipoprotein D

Apolipoprotein D (ApoD) is a 29 KDa glycoprotein first detected in 1963, as a distinct component of the human plasma lipoprotein system (Ayrault-Jarrier et al., 1963), and partially characterized in 1973 (McConathy & Alaupovic, 1976). The deduced amino acid sequence from the cloned human cDNA (D. Drayna et al., 1986) revealed that it is an atypical lipoprotein. It harbors a high degree of homology with the lipocalins, a family of proteins that transport small hydrophobic molecules. Several studies have shown that ApoD is poorly expressed in the liver and intestines, the organs that normally produce apolipoproteins. Instead, ApoD is widely expressed in several other tissues across many species (D. Drayna et al., 1986; P. R. Provost et al., 1990; Séguin et al., 1995; K. M. Smith et al., 1990). A large number of potential ligands of different structure and function have been identified. Due to this apparent ligand heterogeneity and wide tissue distribution, a role as a multi-ligand, multi-function protein has been proposed for ApoD.

ApoD structure

The gene

The *ApoD* gene is located on human chromosome 3 (D. T. Drayna et al., 1987) and mouse chromosome 16 (Warden et al., 1992). The promoter of the human *ApoD* gene contains a large number of regulatory elements among which response elements to steroids, oestrogen, progesterone and glucocorticoids. It also contains response elements to fatty acids, liver X receptors (LXRs), acute phase and serum as well as elements involved in the immune response such as Nuclear Factor kappa B (NF- κ B) (Do Carmo et al., 2007; Do Carmo et al., 2002; Hummasti et al., 2004; Lambert et al.,

1993). The presence of such a large number of regulatory elements contributes to the complex regulation of *ApoD* expression.

The protein

ApoD is highly conserved amongst mammalian species. The human protein shares 87.3% identity with the Rhesus monkey protein and is remarkably similar to the rabbit (79.3%), the mouse (73.1%) and the rat (73.1%) ApoD (Source: Uniprot Database). The amino acid sequence also shares significant similarity with the lipocalin family: 25% with retinol binding protein and 30 to 40% with insect bilin binding protein (D. T. Drayna et al., 1987; Weech et al., 1991). The protein is composed of 169 residues, including a secretion peptide signal of 20 amino acids. Two glycosylation sites (asparagines 45 and 78) account for the molecular weight of the mature protein varying from 20 to 32 kDa (Rassart et al., 2000; Schindler et al., 1995; Weech et al., 1991; C. Y. Yang et al., 1994). An intriguing characteristic of ApoD is that its glycosylation level varies depending on its production site. Cerebral ApoD has a lower molecular weight compared to peripheral ApoD. N-glycosylation removal revealed that this is due to differential glycosylation. Interestingly, this difference in glycosylation level could influence ApoD's function and might be an evidence of different functional roles between brain and peripheral ApoD (H. Li et al., 2016).

The tertiary structure of ApoD is formed from 8 antiparallel β -sheets creating a hydrophobic cavity capable of receiving different ligands (Eichinger et al., 2007; Peitsch & Boguski, 1990) (Figure 1). The human ApoD contains 5 cysteine residues, 4 of which are involved in intramolecular disulfide bonds. The last cysteine residue can form intermolecular disulfide bridges with another ApoD protein (dimers) or with proteins associated with High density lipoproteins (HDL) namely apolipoproteins A-I and A-II (apoA-I, apoA-II) and Lecithin cholesterol acyltransferase (LCAT) (Blanco-

Vaca et al., 1992; Fielding & Fielding, 1980; Weech et al., 1991; C. Y. Yang et al., 1994). While ApoD has mostly been described in its monomeric form, dimers (Bhatia et al., 2013) and tetramers (Kielkopf et al., 2018) have been observed. Oligomerization is a common feature of lipocalins and is known to impact lipocalin ligand binding. ApoD has been shown to dimerize during oxidative stress especially in the hippocampal region of late stage Alzheimer's disease patients. ApoD dimerization seems to occur as an antioxidative response following the interaction of methionine 93 with lipid hydroperoxides, unstable lipid species produced in response to excessive free radical production (Bhatia et al., 2012), which must be cleared from the organism to prevent membrane and tissue damage.

Also, disulfide linked ApoD homodimers have been found in urine (Blanco-Vaca & Pownall, 1993) and tears (Holzfeind et al., 1995), while tetramers have been observed in breast cyst fluids (ApoD's main form in that fluid) (Kielkopf et al., 2018). Additionally, hydrophobic residues are located in close proximity to the open end of ApoD's binding pocket and may facilitate interactions with cell membranes and lipoproteins (Eichinger et al., 2007). ApoD associates most strongly with HDL and to a lower extent to low and very low density lipoproteins (LDL and VLDL) (Perdomo et al., 2010). Biosensor experiments have shown that ApoD mediates HDL2 and 3 interactions with LDL and the cell surface (Braesch-Andersen, Beckman, Paulie, & Kumagai-Braesch, 2014). In addition to its association with plasma lipoproteins, ApoD appear to be a very specific marker of the exosome-containing fraction of the central nervous system (Pascua-Maestro et al., 2018).

ApoD ligands

Arachidonic acid

Arachidonic acid (AA) is the ligand that binds to ApoD with the best known affinity (K_a of 10⁸ M⁻¹ compared to a K_a of 10⁶ M⁻¹ for progesterone) (Morais Cabral et al., 1995). AA is the precursor of prostaglandin synthesis, bioactive molecules that are involved in several biological pathways such as inflammation, platelet aggregation and cellular regulation (Kuehl & Egan, 1980). Indeed, under the action of phospholipase A₂, the AA present in membranes is liberated and becomes the substrate of lipoxygenases and cyclooxygenases (mostly Cox-2) leading to prostaglandin and leukotriene formation in inflammatory situations (W. L. Smith, DeWitt, & Garavito, 2000). Thus, as an AA transporter, ApoD could play an important role in cellular protection and regulation.

Steroids

ApoD (initially named GCDFP-24) is the major protein constituent of human mammary cyst fluid. It binds with a relatively strong affinity to progesterone and pregnenolone and with a weaker affinity to oestrogen (Balbin et al., 1990; Lea, 1988; Pearlman et al., 1973; Vogt & Skerra, 2001). However, another study shows a lack of interaction between ApoD and β-estradiol, suggesting that oestrogen is possibly not a natural ligand of ApoD (Ruiz et al., 2013).

Cholesterol

Depending upon the experimental design, poor or lack of direct binding between ApoD and cholesterol has been reported (Morais Cabral et al., 1995; Patel et al., 1997; Ruiz et al., 2013)(Marcoux-Legault, Brissette and Rassart, unpublished results). Cholesterol is a major membrane and lipoprotein constituent. ApoD was identified as a component of HDL. Thus, in association with LCAT, ApoA-I or CETP (Cholesteryl Ester Transfer Protein), it could be involved in the reverse transport of cholesterol to the liver (Blanco-

Vaca et al., 1992; Spreyer et al., 1990; Weech et al., 1991; C. Y. Yang et al., 1994). The esterification activity of LCAT is increased in the presence of ApoD (Fielding & Fielding, 1980; Steyrer & Kostner, 1988), 2 proteins that were shown to form heterodimers (Blanco-Vaca et al., 1992; Weech et al., 1991).

Other ligands

Molecular modeling studies have revealed that components derived from the heme, such as bilirubin, could be putative ApoD ligands. Accordingly, binding between ApoD and bilirubin was demonstrated (K_a of 3.10^7 M^{-1}) (Peitsch & Boguski, 1990) and this property could promote the interaction of bilirubin with HDL (Goessling & Zucker, 2000). Other ligands have been identified such as E-3-methyl-2-hexenoic acid, a molecule present in axillary secretions (Zeng et al., 1996); retinoic acid, which is involved in cellular differentiation; as well as sphingomyelin and sphingolipids which are major components in HDL and in cellular membranes (Breustedt, Schonfeld, & Skerra, 2006; Rhinn & Dolle, 2012; Ruiz et al., 2013; Vance, 2012). However, as for cholesterol, the binding with some ligands remain rather weak or controversial. The fact that ApoD may bind such a large variety of ligands could be the reflection of a multi-ligand, multi-function activity.

ApoD expression

Tissue expression

ApoD is expressed at different levels in a wide range of tissues in several mammalian species both during developmental and adult stages (Figure 2). The wide species distribution of ApoD supports its evolutionary importance in the chordate lineage (Ganfornina et al., 2005; Sanchez, Ganfornina, Gutierrez, & Marin, 2003) and its amino-acid homology is very high among mammals (Rassart et al., 2000). Since its

characterization in mammalian species, it has also been detected in chicken (Ganfornina et al., 2005), *Drosophila* (Sanchez et al., 2000), plants (Frenette Charron et al., 2002) and bacteria (Bishop et al., 1995). Mostly associated with plasmatic HDL, avian ApoD is present in rapidly growing oocytes, suggesting a role in the transport of lipids during embryogenesis (Vieira, Lindstedt, Schneider, & Vieira, 1995; Y. Yao & Vieira, 2002). In humans, ApoD is poorly expressed in the liver and intestines, the major sites of apolipoprotein synthesis.

In contrast, ApoD mRNA expression is strongest in the mammary glands and central nervous system (Figure 2). However, ApoD protein, as a secreted protein, varies significantly from the mRNA expression. While ApoD doesn't appear to be produced in the liver, the protein is present in high amounts. Similarly, mRNA expression is weak in the adrenals, testis, lungs, kidneys and placenta, but strong at the protein level. ApoD has been detected in multiple tissues in the monkey (K. M. Smith et al., 1990), but the absence of quantified data limits the comparison to human expression. Rats and mice both have an ApoD mRNA expression almost exclusively limited to the CNS (Boyles, Notterpek, Wardell, et al., 1990; Séguin et al., 1995). In mice, most of the protein is also found in the CNS (H. Li et al., 2016). In rats, however, moderate to high protein levels have been found in peripheral tissues (Boyles, Notterpek, Wardell, et al., 1990).

Cellular expression

ApoD mRNA is mostly expressed by fibroblasts, particularly in fibroblasts located in the proximity of blood vessels (P. R. Provost et al., 1991; K. M. Smith et al., 1990). In the nervous system, expression is strong in white matter glial cells, in particular astrocytes and oligodendrocytes. However, in the peripheral nervous system,

expression is detected in endoneural fibroblasts (Boyles, Notterpek, Wardell, et al., 1990; Boyles et al., 1989; Pierre R. Provost et al., 1991).

Modulation of ApoD in physiological conditions

In normal individuals, the serum ApoD concentration varies between 5 and 23 mg/100ml (Camato et al., 1989) but its concentration has been shown to be affected in several studies.

ApoD expression is modulated in pathologies that present metabolic defects such as familial HDL deficiency and Tangier diseases (Alaupovic et al., 1981), familial LCAT deficiency (Albers et al., 1985) and type 2 diabetes (Baker et al., 1994; Hansen et al., 2004). The common link between these diseases could be the activation of pro-inflammatory and/or pro-angiogenic pathways related to the metabolism of AA, the best ApoD ligand (Hummasti et al., 2004; Labrie et al., 2015). A neuroprotective and anti-inflammatory effect of ApoD could result from its capacity to stabilize AA at the cellular membrane or to sequester it, thus preventing its transformation into pro-inflammatory molecules (F. Desmarais et al., 2019; E. A. Thomas et al., 2003; Elizabeth A. Thomas et al., 2003).

Tangier disease is caused by a mutation in the ATP-binding Cassette A1 transporter (ABCA1) gene, which control cholesterol efflux (Bodzioch et al., 1999). ABCA1 loss of function causes cholesterol accumulation in peripheral organs and an increased risk of atherosclerosis (Bodzioch et al., 1999). Considering that ApoD can bind cholesterol, it could facilitate removal of cholesterol excess through the reverse transport via the HDL and therefore protect against atherosclerosis (Pfrieger, 2003; Tall, 2008). Moreover, the protein profile of HDL isolated from atherosclerotic patients shows an

ApoD increase, which could be a compensatory mechanism for cholesterol accumulation (Vaisar et al., 2007). In addition to its accumulation in HDL particles, ApoD is present in atheroma, lipid plaques in arteries, and is associated with excessive cholesterol accumulation in atherosclerotic patients and mouse models of atherosclerosis (Perdomo & Henry Dong, 2009; Sarjeant et al., 2003).

Growth and differentiation

Studies on primary cultures of human fibroblasts have shown that a forced arrest in cell growth can induce ApoD expression (Pierre R. Provost et al., 1991). This induction has also been noted in non-proliferating quiescent and senescent fibroblast cultures and in several other cell types (Do Carmo et al., 2002).

In normal cell culture conditions, ApoD is secreted and reinternalized (Do Carmo et al., 2007; Leung et al., 2004; Sarjeant et al., 2003). ApoD is able to selectively modulate the proliferative response of vascular smooth muscle cells to growth factors by inhibiting nuclear translocation of the active form of ERK1/2 (extracellular signal-regulated kinase 1/2) (Sarjeant et al., 2003).

ApoD expression can be induced in some stress conditions, such as oxidative and inflammatory stresses or UV treatment (Do Carmo et al., 2007). This induction is observed specifically at peroxide concentrations (oxidative stress) and UV doses that induce growth arrest but not apoptosis. Nuclear factors PARP-1 (Poly ADP-ribose polymerase-1) and APEX (Apurinic/Apyrimidinic Endonuclease-I), factors that are upregulated in growth-arrested cells, can both bind the ApoD promoter and induce ApoD expression (Levros et al., 2010). Both APEX and PARP-1 are known to be induced in pathologic situations such as oxidative stress and neurodegenerative

conditions (Duan et al., 2007; Fritz et al., 2003). Moreover, in several stress situations, ApoD is localized to the perinuclear level (Do Carmo et al., 2007).

Several studies have shown an inverse correlation between ApoD expression and cell growth. In parallel, studies on breast cancer cell lines have shown that ApoD expression is inhibited by oestrogens (cell growth inducer) and stimulated by androgens (cell growth inhibitor) (Simard et al., 1990; Simard et al., 1991). Moreover, ApoD expression concomitant with inhibition of cell growth was observed in some breast cancer cell lines treated with interleukin-1 α and retinoic acid (Blais et al., 1994; Y. S. López-Boado et al., 1994). So far, the only known exception is Interleukin-6 as it inhibits both cell proliferation and ApoD expression (Blais et al., 1995).

Beside cell growth, ApoD expression is also linked to cell differentiation. Two mediators of cell differentiation, retinoic acid and 1,25-dihydroxyvitamin D₃ both induce ApoD expression in mammary cancer cells (Y. S. López-Boado et al., 1997; Y. S. López-Boado et al., 1994). This induction appears to be mediated by retinoic acid nuclear receptors (RAR) that reduce cell growth. This suggests that ApoD could be a marker of RAR-mediated differentiation and growth arrest in mammary cancer cells (Lopez-Boado et al., 1996). A similar correlation was also observed in human prostate cancer tissue (Aspinall et al., 1995), where ApoD is mostly present in glandular prostatic epithelium and could be associated with a non-proliferative or differentiated state. In summary, ApoD expression is stimulated in growth arrest, cell senescence and during oxidative and inflammatory stresses. In contrast, ApoD expression is reduced during cell growth.

Influence of metabolic pathways

There is a positive correlation between adipose mass, circulating leptin levels and hypothalamic ApoD expression (Liu et al., 2001). However, this correlation disappears

in ob/ob obese mice (leptin deficient) and db/db mice (harboring a mutation in the leptin receptor). These mice present a reduced level of hypothalamic ApoD compared to wild-type mice. The same study shows a specific and direct interaction of ApoD and the cytoplasmic portion of the long form of the leptin receptor (Liu et al., 2001). This suggests that ApoD in the hypothalamus is involved in the signaling pathway that controls appetite and probably fat accumulation. Plasma ApoD levels decrease significantly during normal uncomplicated pregnancy. ApoD is further decreased in women with excessive gestational weight gain and their newborns. In these women, the ApoD concentration was tightly associated with the lipid parameters (Do Carmo, Forest, et al., 2009). In morbidly obese women (BMI over 40) adipose tissues, ApoD protein expression is positively correlated with parameters of metabolic health. Women with high levels of ApoD in their round ligament, an adipose depot that form on the liver of obese individuals, have lower insulin resistance, insulin blood levels as well as lower circulating Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α) and Plasminogen Activator Inhibitor-1 levels (F. Desmarais et al., 2018). This could indicate that ApoD's higher expression is beneficial in obesogenic conditions. Since TNF- α is a potent disruptor of insulin signaling (Akash, Rehman, & Liaqat, 2018), it is possible that ApoD's association with increased insulin sensitivity is linked to an anti-inflammatory effect of ApoD in the round ligament. This association has yet to be evaluated in men.

Interestingly, ApoD has been identified as a LXR-regulated gene that is upregulated following adipocyte differentiation. It has been hypothesised that ApoD could transport ligands for LXRs or PPARs (peroxisome proliferator-activated receptor) in differentiated adipocytes (Hummasti et al., 2004). Treatment of 3T3-L1 adipocytes with AA, ApoD's preferential ligand, increases the level of GLUT1 and GLUT4 (glucose transporter) incorporation into the plasma membranes and consequently glucose uptake. This phenomenon is dependent upon an intact PPAR γ and lipoxygenase but not cyclooxygenase activity (Nugent et al., 2001). Part of ApoD's

effect on glucose homeostasis in adipose tissues could therefore be due to the modulation of eicosanoid production or delivery.

A role for ApoD in hepatic lipid metabolism was provided by a study on transgenic mice overexpressing human ApoD in their central nervous system (CNS) (Do Carmo, Fournier, et al., 2009). These mice also showed ApoD transgenic protein accumulation in the liver and slowly developed a hepatic and muscular steatosis accompanied with insulin resistance (Do Carmo, Fournier, et al., 2009). However, these mice were not obese or diabetic and they did not develop inflammation. The evolution/development of this pathology was triggered at least in part by precise signaling events involving prostanoids derived from AA and PPAR γ activation (F. Desmarais et al., 2019; Labrie et al., 2015). ApoD-induced lipid accumulation was not due to *de novo* lipogenesis but rather from increased lipid uptake. An important characteristic of ApoD induced hepatic steatosis is that every omega-3 and omega-6 fatty acids (including AA) are preferentially accumulated over saturated and mono-unsaturated fatty acids. Additionally, omega-3 fatty acids (mainly DHA) appear to be accumulated at an even greater pace compared to omega-6 fatty acids, resulting in a more favorable omega-3/omega-6 balance in transgenic mice compared to wild type controls (F. Desmarais et al., 2019). This intriguing phenomenon suggests that DHA and/or other omega-3 fatty acids might also be ApoD ligands. Together, the favorable omega-3/omega-6 balance, the production of anti-inflammatory eicosanoids and the activation of PPAR γ appear to prevent chronic inflammation despite extensive lipid accumulation (F. Desmarais et al., 2019). As for the adipose tissues, the full extent of ApoD's involvement in AA metabolism is unknown. Interestingly, ApoD overexpression in HepG2 cells increases PPAR γ transcriptional activity, a phenomenon that is amplified by the addition of AA (Labrie et al., 2015). Earlier articles show that ApoD can limit inflammation by sequestering AA in cell membranes (Do Carmo et al., 2008; Elizabeth A. Thomas et al., 2003) but ApoD might also influence the fate of AA upon release.

An additional effect of ApoD might occur through its capacity to associate with osteopontin (OPN) (Jin et al., 2006). OPN is a negatively charged extracellular protein found in bones and produced by various cell types including kidney, placenta, arterial smooth muscle and immune cells. OPN promotes cell migration, adhesion, and activation of T lymphocytes and macrophages (Gravallese, 2003; Jurets et al., 2016). OPN is overexpressed in atherosclerosis and in obesity-induced adipose tissue inflammation where it mediates macrophage infiltration (Giachelli et al., 1995; Nomiyama et al., 2007). Interestingly, ApoD reduces cell invasiveness by blocking OPN-mediated cell adhesion and proliferation (Jin et al., 2006). Remarkably, OPN-deficient obese mice display improved insulin sensitivity and decreased adipose tissue macrophage infiltration as well as decreased inflammation (Nomiyama et al., 2007). Therefore, blockage of OPN function by ApoD could further explain its anti-inflammatory and insulin sensitizing effects. OPN is also an important factor in liver inflammation, fibrosis and carcinogenesis (Bruha et al., 2020). The interaction between ApoD and OPN could constitute a previously overlooked mechanism by which ApoD can limit the deleterious effects occurring during the development of hepatic steatosis in transgenic mice (Do Carmo, Fournier, et al., 2009).

ApoD-null mice display non-fasting hypertriglyceridemia and a 30% to 50% increase in food intake, yet do not show an increase in body weight, and have normal glucose tolerance and islet morphology. In these mice, adipose tissue lipoprotein lipase (LPL) activity is reduced by 35% and triglyceride hepatic content is low (Jimenez-Palomares et al., 2011). Inversely, hepatic transitory overexpression of ApoD in CD-1 mice increases plasmatic LPL activity and postprandial triglyceride clearance. *In vitro*, ApoD dose-dependently increases free fatty acid release from VLDL-triglycerides (Perdomo et al., 2010).

ApoD-null female mice display progressive bone loss with aging with a 50% reduction in trabecular bone volume (Martineau et al., 2016). Histochemistry indicates significantly higher osteoblast surface and number of osteoclasts in femora. Also, ApoD-null females and males present a 24% reduction in cortical bone volume. These results indicate that ApoD influences bone metabolism in mice in a gender-specific manner (Martineau et al., 2016). The receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL), the key final effector of osteoclastogenesis and bone resorption, is overexpressed in bone marrow mesenchymal cells isolated from ApoD null mice. This is reversed *in vitro* by treatment with human ApoD. RANKL expression and secretion by osteoblasts is stimulated by inflammatory cytokines such as IL-1, TNF- α , and M-CSF (Weitzmann, 2013). In this study, ApoD was suggested to act as an anti-inflammatory and antioxidant agent. An additional mechanism for ApoD's role in bone metabolism could involve ApoD's blockage of OPN function (Jin et al., 2006). OPN is implicated in the activation of the bone resorption process; it serves as an attachment protein for osteoclast to adhere to the bone matrix (Rittling et al., 1998; Weber & Cantor, 1996).

In summary, ApoD appears to be a beneficial actor in both lipid and bone metabolism as it is associated with inflammation resorption as well as bone turnover regulation.

Role in development processes

A modulation of ApoD expression is observed during pregnancy and embryonic development. Low levels of ApoD transcripts are observed in guinea pig embryos (Pierre R. Provost, Tremblay, El-Amine, & Bélanger, 1995). In mice, embryonic ApoD expression begins between days 8 and 9 and is selectively modulated until birth (Sánchez, Ganfornina, & Martínez, 2002). In rats, the induction of ApoD during embryo development coincides with active myelination and synaptogenesis (Ong et al.,

1997). In chickens, ApoD is present in the rapidly growing oocyte and is associated with mobilization and transport of lipids (Vieira et al., 1995).

In humans, ApoD is strongly expressed in the endometrium during implantation and in the placenta (D. Drayna et al., 1986; Kao et al., 2002). ApoD plasmatic levels decrease during pregnancy and are even lower in women that gained excessive weight (Do Carmo, Forest, et al., 2009).

Androgen insensitivity syndrome is the most common cause of sexual development disorder and is usually due to a defective androgen receptor. The ApoD transcript is one of the few transcripts significantly upregulated by dihydrotestosterone in human male genital fibroblasts and is under consideration as a marker of androgen sensitivity (Appari et al., 2009). The function of ApoD in male genital formation is still unclear. Tanase-Nakao K. *et al.*, 2019 proposed that ApoD could be involved in genital masculinization by regulating angiogenesis. They also recognized that dynamic cell-to-cell interactions are necessary for genital masculinization (Tanase-Nakao et al., 2019). ApoD is implicated in astrocyte to neuron communication through extracellular vesicle exchange (Pascua-Maestro et al., 2018). The authors show that ApoD, mostly expressed by astrocytes, is exclusively transported to neurons by extracellular vesicle and internalized to promote integrity and survival. It is plausible that ApoD could be similarly implicated in the cell-to-cell interactions taking place during genital masculinization.

During angiogenesis, endothelial and mural cells need to communicate to produce functional blood vessels. A multitude of genes, including ApoD, are modulated during this process. One study showed that ApoD is downregulated by NOTCH3 in mural cell during angiogenesis. That same study showed that ApoD negatively regulates cell adhesion by reducing focal contacts and that ApoD downregulation by endothelial cells

is necessary for vessel maturation (Pajaniappan et al., 2011). ApoD overexpression in response to LXR activation was also shown to suppress the tube formation of human umbilical vein endothelial cells. ApoD, interacting with SR-B1, appears to suppress phosphorylation of AKT, which in turn inhibits NF- κ B and eNOS. The resulting effect is the reduced expression of Snail and matrix metalloproteinases and thus the suppression of the angiogenesis process (Lai et al., 2017). Other studies however, showed that ApoD and platelet-derived growth factor (PDGF)-BB have synergetic action in promoting vascular smooth muscle migration (Leung et al., 2004) and that ApoD is strongly expressed in both developing and mature perivascular fibroblasts (Pierre R. Provost et al., 1991; Sánchez et al., 2002; K. M. Smith et al., 1990) suggesting that ApoD expression might only be suppressed at specific steps during the angiogenesis process.

Role in cancer

ApoD is expressed and modulated in several cancers. It is overexpressed in numerous types of tissue carcinomas, such as breast, ovaries, prostate, skin and CNS. In prostate, pancreas and skin, a high level of ApoD expression is related to cancer invasiveness (Ashida et al., 2004; Aspinall et al., 1995; Hall et al., 2004; S. X. D. Zhang et al., 1998). Additionally, higher ApoD expression was also associated with shorter survival and recurrence-free survival in non-small cell lung cancer (Cury et al., 2019). However, early research on breast and CNS cancers strongly associated increased ApoD expression to a highly differentiated, non-invasive and non-metastatic state (Hunter et al., 2002; Porter et al., 2003; Serra Diaz et al., 1999). ApoD overexpression is often linked to a decrease of cancer relapse and thus better survival for patients with these cancer types (Diez-Itza et al., 1994). Some studies suggest that growth arrest due to differentiation in these cancers explains the high ApoD expression. This increase of

ApoD expression could be an unfavorable factor for cancer progression (Iacobuzio-Donahue, Ryu, Hruban, & Kern, 2002; Miranda et al., 2003; Ryu, Jones, Hollingsworth, Hruban, & Kern, 2001; West et al., 2004). It remains to be determined whether ApoD expression is a cause or a consequence of cell transformation. Interestingly, ApoD reduces OPN-mediated adherence, invasiveness, and proliferation of Rama37 breast cancer cells *in vitro* (Jin et al., 2006). OPN expression is increased in transformed cells and is inversely correlated with breast cancer patient survival (Rudland et al., 2002). OPN is thought to facilitate invasion by upregulating the expression of matrix metalloproteinase 9 through NF- κ B activation (R. Zhang, Pan, Huang, Weber, & Zhang, 2011).

A recent study performed on a cohort of patients diagnosed with invasive ductal breast carcinoma shows that ApoD could be an independent predictor of metastasis free survival and overall survival in invasive breast cancer. Increased ApoD expression was associated with poor patient outcome (Jankovic-Karasoulos et al., 2020), a result shared with another research team studying breast cancer outcomes in patients over the age of 70 (Soiland et al., 2009). It is important to note that patients in the Soiland et al., 2009 study were under tamoxifen therapy, a drug used to treat estrogen receptor-positive tumors (Harbeck et al., 2019). ApoD can bind tamoxifen and is likely able to interfere with this treatment approach. Accordingly, ApoD negative patients on tamoxifen had better outcomes compared with ApoD positive patients under the same tamoxifen therapy (Soiland et al., 2009). Future studies on ApoD's role in cancer progression should take caution to separate ApoD's biological effects from its potential interference with treatment agents. Although both effects are of considerable importance for breast cancer research and the development of therapies.

What differentiates ApoD's effect on cancer outcomes in different cancer types is largely unknown. Zhou Y. and Luo G., 2020 argue that ApoD's effect on cancer

depends on which cell types are transformed. According to them, ApoD is beneficial in parenchymal tumors because it helps to limit cell cycle progression and induces cell senescence. ApoD interferes with arachidonic acid metabolism by sequestering it in cell membranes. Therefore, ApoD reduces the production of prostaglandins and leukotrienes, which can promote cell proliferation and neo-angiogenesis (Matsuyama et al., 2005; Romano & Claria, 2003). ApoD would hence indirectly improve prognosis via several mechanisms. However, ApoD may be deleterious when it affects stromal cells because the cell senescence it induces stimulates the production of inflammatory cytokines (TNF- α and IL-1 β) and matrix metalloproteinases. These two factors lead to the degradation of the extracellular matrix and promote tumor malignancy (Kleiner & Stetler-Stevenson, 1999). These opposing effects could explain some of the contradictory reports concerning ApoD's association with cancer progression and outcomes. More mechanistic studies are needed to better understand ApoD's role in cancer.

ApoD and the nervous system

ApoD is expressed by Schwann cells of the peripheral nervous system (Garcia-Mateo et al., 2014). ApoD expression is low in the peripheral nervous fibers of the rat. However, ApoD and apolipoprotein E (ApoE) expression increases drastically after a nerve crush injury (Boyles, Notterpek, & Anderson, 1990). ApoD expression is higher on the site of a crush injury than on the site of a sectioned nerve (Boyles, Notterpek, & Anderson, 1990; Boyles, Notterpek, Wardell, et al., 1990; Spreyer et al., 1990). This was also observed in the rabbit and marmoset monkey (Boyles, Notterpek, Wardell, et al., 1990). After a peripheral nerve lesion, myelin degradation releases a large quantity of lipids including cholesterol, which are stocked and reutilized during regeneration. ApoD could be involved in this regeneration process as a lipid transporter. This longstanding hypothesis was confirmed by a study on nerve regeneration in ApoD-null

mice and in transgenic mice overexpressing the human ApoD protein (Ganfornina et al., 2010). This study showed that axonal regeneration and remyelination are delayed in the absence of ApoD and stimulated in the transgenic animals. ApoD appears to be essential for proper myelin extracellular leaflet compaction. The repulsive force generated by densely layered, negatively charged glycolyx proteins can prevent, if not cleared, the extensive bilayer-bilayer membrane interactions that need to occur during myelination. ApoD deficiency in mice is associated with improper glycolyx clearance and incomplete myelin compaction (Garcia-Mateo et al., 2018).

In human, ApoD is concentrated in the cytosol of white matter glial cells (C. Y. Hu, Ong, Sundaram, Chan, & Patel, 2001; Ana Navarro, Tolivia, Astudillo, & del Valle, 1998). In the grey matter, ApoD is mostly located in protoplasmic astrocytes and in a few neurons (A. Navarro, Del Valle, & Tolivia, 2004; Ana Navarro et al., 1998). ApoD is also detected in the cytosol of perivascular cells and in the pericyte lysosomes of neocortex blood vessel walls (C. Y. Hu et al., 2001). This suggests a potential role for ApoD in the transport of small hydrophobic molecules in glial cells and in the blood vessels of the CNS. Interestingly, increased ApoD expression is observed in the cerebral cortex of aged patients, possibly due to the increased number of reactive astrocytes (del Valle, Navarro, Astudillo, & Tolivia, 2003; Kalman et al., 2000). Increased ApoD expression is also observed in several neurodegenerative diseases.

ApoD and neurodegenerative diseases

Alzheimer's disease

ApoD protein levels are strongly increased in the cerebrospinal fluid, hippocampus and cerebral cortex of Alzheimer's patients (Desai et al., 2005; Kalman et al., 2000; Terrisse et al., 1998). These elevated levels are correlated with the number of neurofibrillary tangles (NFT) but not with senile plaques (Belloir, Kovari, Surini-

Demiri, & Savioz, 2001; Glöckner & Ohm, 2003). ApoD transcription is altered before these NFT appear and the ApoD protein is rarely observed within these structures (Belloir et al., 2001). The close relationship between Alzheimer's disease and ApoE has been clearly established and the E4 isoform represents an important risk factor in the development of the disease (Henderson & Finch, 1989). In the hippocampus and cerebrospinal fluid, ApoD levels correlate with the Braak degeneration stage (Glöckner & Ohm, 2003) and with the ApoE4 genotype (Glöckner & Ohm, 2003). Surprisingly though, it is independent of ApoE protein concentration (Terrisse et al., 1998). In ApoE deficient mice, brain cholesterol levels remain unaltered, possibly because of a compensatory process involving increased ApoD and ABCA1 protein levels (Jansen et al., 2009). In contrast, knock-in mice expressing the ApoE3 and E4 isoforms present a significant increase in cholesterol and its precursors in the brain. Interestingly, ApoD is poorly expressed in these mice's brains (Jansen et al., 2009). In contrast to the ApoE2 isoform, both E3 and E4 isoforms are able to bind the ApoD promoter and repress its activity in U87 human glioblastomas (Levros, Labrie, Charfi, & Rassart, 2013). Thus, the poor increase of ApoD expression in mice expressing ApoE3 and E4 could be due to a direct action on the ApoD promoter accompanied with the activator effect of cholesterol accumulation.

Schizophrenia

Schizophrenia is a severe and chronic psychotic disorder caused by neurotransmitter activity malfunction that affects serotonergic, glutamatergic and dopaminergic systems (Jones & Pilowsky, 2002; Konradi & Heckers, 2003). This neuropsychiatric pathology is characterized by an alteration in phospholipid metabolism as well as a defect in AA incorporation in platelets and erythrocytes that could contribute to the impairment of neurotransmitter activity (Horrobin, 1998; Laugharne, Mellor, & Peet, 1996; Jeffrey K. Yao, van Kammen, & Gurklis, 1996). AA deficiency has been

observed in schizophrenic patients (E. A. Thomas et al., 2003; J. K. Yao, Thomas, Reddy, & Keshavan, 2005). As previously mentioned, AA is the best-known ligand of ApoD (Morais Cabral et al., 1995). The plasma and post-mortem brains of schizophrenic patients also show an alteration of ApoD expression (Mahadik, 2002; E. A. Thomas et al., 2001). Increased ApoD protein levels are found in the brains of post-mortem patients as well as in rats treated with clozapine, an antipsychotic atypical drug effective against schizophrenia (Ciapparelli et al., 2003; Mahadik, 2002; E. A. Thomas et al., 2001). Levels of AA increased at the erythrocyte membrane in clozapine-treated schizophrenic patients (Vaddadi, 1992; N. P. Walker, Fox, & Whalley, 1999). Thus, an increased expression of ApoD, induced by antipsychotic drugs like clozapine, could facilitate AA membrane incorporation. This close relationship between ApoD expression and AA membrane levels in the presence of clozapine has been demonstrated in mice (E. A. Thomas & Yao, 2007).

Niemann-Pick type C disease

Niemann-Pick type C (NPC) disease is a genetic disorder affecting cellular cholesterol transport, which results in accumulation of non-esterified cholesterol in late endosomes and lysosomes (Kolodny, 2000). An important increase in ApoD expression was observed in the plasma and the brain of a murine model of NPC disease. High levels of ApoD were also observed in the heart, adipose tissue and thymus (Suresh, Yan, Patel, Patel, & Patel, 1998; Yoshida et al., 1996). NPC disease is characterized by a chronic progressive neurodegeneration suggesting a higher vulnerability of neuronal cells following the disruption of intracellular cholesterol trafficking (Sevin et al., 2007; Suresh et al., 1998). In comparison with other tissues, the brain is strongly enriched in cholesterol as it is found in high concentrations in the myelin sheath surrounding axons. Thus, an increased expression of ApoD which binds cholesterol could constitute an

attempt at remediating the intracellular cholesterol disruption experienced by NPC mice.

Other neuropathologies and neurodegenerative lesions

In a rat model of entorhinal cortex lesion, ApoD increases during CNS re-innervation and repair (Terrisse et al., 1999) and its expression is detected in astrocytes and neurons. ApoD mRNA and protein levels increase in the ipsilateral region of the hippocampus as early as 2 days post-lesion, remain high for 10 days and return to normal after 14 days, a period considered necessary for complete re-innervation. Similar results were obtained after kainic acid injection in the hippocampus (Montpied et al., 1999; Ong et al., 1997) or after an experimentally induced stroke (Rickhag et al., 2008; Rickhag et al., 2006). In an experimental model of maternal hyper and hypothyroidism associated with oxidative stress changes in the brain, the hippocampal region of rat pups showed a proportional increase of ApoD expression (Salami, Bandegi, Sameni, Vafaei, & Pakdel, 2019).

In humans, ApoD expression is strongly increased in glial cells of the substantia nigra of patients with Parkinson's disease (Ordonez et al., 2006). Increased ApoD expression is also observed in the cerebrospinal fluid of patients having experienced a stroke (Terrisse et al., 1998) and in patients with multiple sclerosis (Reindl et al., 2001). There is a significant correlation of ApoD concentration with age in patients older than 65 years (Waldner, Dassati, Redl, Smania, & Gandolfi, 2018). Also, a significant increase of ApoD was detected in the plasma of patients with Parkinson's disease compared with healthy patients suggesting that it could be a marker for disease progression. Altogether, it appears that ApoD plays an important role in neuron preservation and protection following neurologic impairment.

Neuroprotective role of ApoD

Several studies confirm the neuroprotective role of ApoD in the presence of different neurodegenerative inducers such as oxidative stress, inflammatory stress and excitotoxicity (Do Carmo et al., 2008; Ganfornina et al., 2008; Najyb et al., 2017).

Transgenic mice overexpressing the human ApoD protein are an appropriate model to study its neuroprotective role. Human ApoD overexpression in the mouse brain increases survival in neurodegenerative conditions. The mice are less sensitive to oxidative stress induced by paraquat, a generator of free oxygen radicals and display a reduced level of lipid peroxidation (Ganfornina et al., 2008). In contrast, mice lacking ApoD present an increased sensitivity to oxidative stress, increased brain lipid peroxidation and impairment of locomotor and learning abilities (Ganfornina et al., 2008). Similarly, the loss of Lazarillo (the *Drosophila* homolog of ApoD) increases lipid peroxidation and sensitivity to oxidative stress (Sanchez et al., 2000; Sanchez et al., 2006). These *Drosophila* mutants show reduced longevity. In contrast, Lazarillo overexpression increases longevity by 26% and allows for a strong resistance against oxidative stress (Hull-Thompson et al., 2009; Ruiz, Wicker-Thomas, Sanchez, & Ganfornina, 2012; D. W. Walker, Muffat, Rundel, & Benzer, 2006). Overexpression of human ApoD in *Drosophila* shows similar effects suggesting that the ApoD role is conserved (Muffat et al., 2008). Moreover, the antioxidative role of ApoD is due to the residue methionine 93 which prevents lipid peroxidation (Bhatia et al., 2012; Oakley, Bhatia, Ecroyd, & Garner, 2012).

A neuroprotective role for ApoD has also been observed following an inflammatory stress. Intracerebral injection of the human coronavirus OC43 in mice causes encephalitis and an inflammatory demyelination of the CNS very similar to multiple sclerosis (Jacomy & Talbot, 2003) accompanied by cellular death. However, transgenic mice overexpressing human ApoD treated by the OC43 coronavirus presented a better survival rate and a reduced level of inflammation (Do Carmo et al., 2008). This

protection appeared to be correlated with a restricted activity of the phospholipase A2 pathway. Interestingly, ApoD needs to be contained in extracellular vesicles to exert its full neuroprotective effects (Pascua-Maestro et al., 2018).

ApoD-null mice and transgenic mice overexpressing human ApoD were crossed with APP-PS1 amyloidogenic mice, a mouse model of Alzheimer's disease (P. Li et al., 2015). The absence of ApoD caused a 2-fold increase in hippocampal amyloid plaque load. In contrast, neuronal expression of the ApoD transgene reduced hippocampal plaque load by about 35% and was associated with a 60% decrease in amyloid β 1-40 peptide levels, as well as a 34% decrease in insoluble amyloid β 1-42 peptide. This study provides clear evidence that ApoD regulates amyloid plaque pathology, at least in the mouse.

Kainic acid (KA), an analog of glutamate, can induce the over-activation of glutamate receptors and is widely used as a model to explore excitotoxic processes in neurodegenerative injury (Zheng, Zhang, Luo, & Zhu, 2011). Because of the high density of kainate receptors, the hippocampus is more sensible to KA-induced neurotoxicity (Darstein, Petralia, Swanson, Wenthold, & Heinemann, 2003). ApoD levels are increased in the hippocampus of KA-treated rats (Montpied et al., 1999; Ong et al., 1997). Also, glutamatergic pathways seem to be particularly affected in ApoD-null mice with a 20% decrease in the density of kainate receptors in the CA 2-3 subfields of the hippocampus, a global decrease in AMPA receptors and a global increase in muscarinic M2/M4 receptors (Boer et al., 2010). These changes may contribute to impairments in learning and memory, motor tasks and orientation-based tasks observed in these animals (Ganfornina et al., 2008), all of which involve glutamatergic neurotransmission.

Transgenic mice overexpressing human ApoD show an increased resistance to KA-induced seizures, a significant reduction of inflammatory responses and a stronger protection against KA-induced cell apoptosis in the hippocampus. This ApoD-mediated protection against KA-induced toxicity was imputed in part to increased plasma membrane Ca²⁺ ATPase type 2 expression (1.7 fold), decreased NMDA receptor subunit NR2B levels (30%) and a modified lipid metabolism. Indeed, ApoD can diminish intracellular cholesterol content in primary hippocampal neurons and in the brain of transgenic mice. In addition, ApoD can be internalized by neurons, a process that is accentuated in aging and injury (Najyb et al., 2017). ApoD protection appears to be conferred not only through its anti-inflammatory properties but also through the regulation of cholesterol distribution in neurons, and by affecting the levels of proteins limiting excitotoxic effects. Though ApoD's mode of action has yet to be fully understood, the studies presented above provide clues on the mechanisms involved in ApoD-mediated protection from neurodegenerative conditions. One thing is clear however, ApoD is an important factor in brain homeostasis, repair, and resistance to neurodegenerative stress.

The ApoD receptor

Several studies have shown that ApoD is secreted and reinternalized (Do Carmo et al., 2007; Leung et al., 2004; Najyb et al., 2017; Sarjeant et al., 2003). This suggests that reinternalization could be receptor-mediated. The transmembrane glycoprotein basigin (BSG; CD147) was identified as a receptor for ApoD (Najyb et al., 2015). BSG is a membrane glycoprotein receptor, member of the immunoglobulin family, involved in several pathologies such as cancer and Alzheimer disease (Iacono, Brown, Greene, & Saouaf, 2007). Internalized ApoD localizes with BSG into vesicular compartments. Downregulation of BSG disrupts the cellular internalization of ApoD. In contrast, overexpression of BSG in SH-5YSY cells, which poorly express BSG, restores the

uptake of ApoD. Cyclophilin A, a known ligand of BSG, competitively reduces ApoD internalization confirming that BSG is a key player in the ApoD internalization process.

In summary, BSG is a likely ApoD receptor. This provides additional clues on the mechanisms involved in ApoD-mediated functions, including neuroprotection. Interestingly, BSG is a key player in tumor progression toward metastasis. Its activation results in increased proliferation, invasiveness, angiogenesis and drug resistance, and in limiting apoptosis (Xin et al., 2016). Considering the link between ApoD and cancer progression, it would be reasonable to assume that ApoD could be involved in these BSG-dependent mechanisms.

Conclusion

Despite numerous studies on ApoD, little is understood about its physiological function(s). In the nervous system, its role is very likely one of neuroprotection and repair most likely due to its antioxidant and anti-inflammatory properties. However, ApoD appears to be involved in several other situations and pathologies such as development, cell growth and differentiation, cancer and neurodegenerative diseases. Because of its capacity to bind a wide variety of ligands from bilirubin to its best-known ligand arachidonic acid, it seems quite possible that ApoD acts through different pathways in each tissue or organ where it is found. An interesting prospect for future research is ApoD's interaction with OPN. Blockage of OPN function could have multiple health benefits including the limitation of adipose tissue inflammation, bone loss and better outcomes for some cancer types. ApoD affects longevity, is involved in bone and lipid metabolism, acts as an antioxidant and limits inflammation. These are all critical systems relevant to the pathophysiology of aging in which ApoD could serve as a therapeutic target. However, much needs to be learned before this eventuality can be realistically considered.

Acknowledgements

Part of this work was supported by the Canadian Institutes of Health Research grant MOP-15677 (ER).

Figure legends

Figure 1. Structure of human ApoD in complex with progesterone (adapted from Eichinger et al., 2007). Left: front view showing the 8 anti-parallel β -strands (yellow) structure forming the hydrophobic cavity typical of the lipocalins. Loops A/B, C/D, E/F and G/H link the β -strands at the open end of the protein. Other loops are present at the opposite end of the protein (white). There are 2 α -helix (purple) located close to the cavity, one of which is able to close the cavity. The two glycosylated residues (N45 and N78) are shown. The 2 disulfide bridges are not visible. Right: top view of the cavity showing the progesterone ligand (grey).

Loops A/B, E/F and G/H are rich in hydrophobic residues and very likely enable the protein to interact with HDL and with membranes. For details, see Eichinger et al., 2007.

Figure 2: Relative ApoD mRNA and protein expression in tissues of different species. ApoD expression in the figure is an average value from the literature. ApoD expression in a tissue is expressed as a percentage of the strongest ApoD tissue expression for that species. Tissue expression between different species should not be compared as they are only relative to their own species. Tissues in which ApoD was detected but not quantified are noted in yellow. Expression data were obtained from multiple sources: Human: (Uhlen et al. 2015) data available at <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000189058-APOD/tissue>, (Fishilevich et al. 2016; Ben-Ari Fuchs et al. 2016) data available at <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=APOD>, (Séguin et al., 1995; Drayna et al. 1986); Rhesus (Smith et al., 1990); Rabbit (Provost et al. 1990); Mouse (Séguin et al., 1995; Do Carmo et al. 2009a; Li et al. 2016; Cofer and Ross 1996); Rat (Séguin, Desforges, and Rassart 1995; Boyles et al. 1990); Guinea pig (Provost et al. 1995); Chicken (Ganforina et al. 2005).

Figure A2.1

BIBLIOGRAPHIE

- Abo El-Magd, N. F., El-Karef, A., El-Shishtawy, M. M., & Eissa, L. A. (2019). Glycyrrhizin and Omega-3 fatty acids have hepatoprotective roles through toll-like receptor-4. *Egyptian Journal of Basic and Applied Sciences*, 6(1), 82-98. doi:10.1080/2314808x.2019.1669111
- Agrawal, N., Delanoue, R., Mauri, A., Basco, D., Pasco, M., Thorens, B., & Leopold, P. (2016). The Drosophila TNF Eiger Is an Adipokine that Acts on Insulin-Producing Cells to Mediate Nutrient Response. *Cell Metab*, 23(4), 675-684. doi:10.1016/j.cmet.2016.03.003
- Ahmadian, M., Suh, J. M., Hah, N., Liddle, C., Atkins, A. R., Downes, M., & Evans, R. M. (2013). PPARgamma signaling and metabolism: the good, the bad and the future. *Nat Med*, 19(5), 557-566. doi:10.1038/nm.3159
- Akagi, D., Chen, M., Toy, R., Chatterjee, A., & Conte, M. S. (2015). Systemic delivery of proresolving lipid mediators resolvin D2 and maresin 1 attenuates intimal hyperplasia in mice. *FASEB J*, 29(6), 2504-2513. doi:10.1096/fj.14-265363
- Akamine, E. H., Urakawa, T. A., de Oliveira, M. A., Nigro, D., de Carvalho, M. H., de Cassia, A. T. R., & Fortes, Z. B. (2006). Decreased endothelium-dependent vasodilation in diabetic female rats: role of prostanoids. *J Vasc Res*, 43(5), 401-410. doi:10.1159/000094790
- Akash, M. S. H., Rehman, K., & Liaqat, A. (2018). Tumor Necrosis Factor-Alpha: Role in Development of Insulin Resistance and Pathogenesis of Type 2 Diabetes Mellitus. *J Cell Biochem*, 119(1), 105-110. doi:10.1002/jcb.26174
- Alaupovic, P., Schaefer, E. J., McConathy, W. J., Fesmire, J. D., Bryan, & Brewer, H. (1981). Plasma apolipoprotein concentrations in familial apolipoprotein A-I and A-II deficiency (Tangier disease). *Metabolism*, 30(8), 805-809. doi:10.1016/0026-0495(81)90027-5
- Albers, J. J., Adolphson, J., Ching-Hong, C., Naoki, M., Sumiko, H., & Yasuo, A. (1985). Defective enzyme causes lecithin-cholesterol acyltransferase deficiency in a Japanese kindred. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism*, 835(2), 253-257. doi:10.1016/0005-2760(85)90280-2
- Aldridge, G. M., Podrebarac, D. M., Greenough, W. T., & Weiler, I. J. (2008). The use of total protein stains as loading controls: an alternative to high-abundance single-protein controls in semi-quantitative immunoblotting. *J Neurosci Methods*, 172(2), 250-254. doi:10.1016/j.jneumeth.2008.05.003

- Aljohani, A., Khan, M. I., Bonneville, A., Guo, C., Jeffery, J., O'Neill, L., . . . Ntambi, J. M. (2019). Hepatic stearoyl CoA desaturase 1 deficiency increases glucose uptake in adipose tissue partially through the PGC-1alpha-FGF21 axis in mice. *J Biol Chem*, *294*(51), 19475-19485. doi:10.1074/jbc.RA119.009868
- Alpini, G., Phillips, J. O., Vroman, B., & LaRusso, N. F. (1994). Recent advances in the isolation of liver cells. *Hepatology*, *20*(2), 494-514.
- Alvarez-Erviti, L., Seow, Y., Yin, H., Betts, C., Lakhali, S., & Wood, M. J. (2011). Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes. *Nat Biotechnol*, *29*(4), 341-345. doi:10.1038/nbt.1807
- Alves, C., de Melo, N., Fraceto, L., de Araujo, D., & Napimoga, M. (2011). Effects of 15d-PGJ(2)-loaded poly(D,L-lactide-co-glycolide) nanocapsules on inflammation. *Br J Pharmacol*, *162*(3), 623-632. doi:10.1111/j.1476-5381.2010.01057.x
- Alzheimer's, A. (2013). 2013 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimers Dement*, *9*(2), 208-245. doi:10.1016/j.jalz.2013.02.003
- Andersen, J. T., Dalhus, B., Viuff, D., Ravn, B. T., Gunnarsen, K. S., Plumridge, A., . . . Cameron, J. (2014). Extending serum half-life of albumin by engineering neonatal Fc receptor (FcRn) binding. *J Biol Chem*, *289*(19), 13492-13502. doi:10.1074/jbc.M114.549832
- Anhe, F. F., Roy, D., Pilon, G., Dudonne, S., Matamoros, S., Varin, T. V., . . . Marette, A. (2015). A polyphenol-rich cranberry extract protects from diet-induced obesity, insulin resistance and intestinal inflammation in association with increased Akkermansia spp. population in the gut microbiota of mice. *Gut*, *64*(6), 872-883. doi:10.1136/gutjnl-2014-307142
- Appari, M., Werner, R., Wunsch, L., Cario, G., Demeter, J., Hiort, O., . . . Holterhus, P. M. (2009). Apolipoprotein D (APOD) is a putative biomarker of androgen receptor function in androgen insensitivity syndrome. *J Mol Med (Berl)*, *87*(6), 623-632. doi:10.1007/s00109-009-0462-3
- Arey, B. (2012). The Role of Glycosylation in Receptor Signaling. In S. Petrescu (Ed.), *Glycosylation* (pp. 273-286): IntechOpen.
- Armstrong, J. M., Chapple, D., Dusting, G. J., Hughes, R., Moncada, S., & Vane, J. R. (1977). Cardiovascular actions of prostacyclin (PGI₂) in chloralose anaesthetized dogs [proceedings]. *Br J Pharmacol*, *61*(1), 136P.
- Ashida, S., Nakagawa, H., Katagiri, T., Furihata, M., Iizumi, M., Anazawa, Y., . . . Nakamura, Y. (2004). Molecular features of the transition from prostatic intraepithelial neoplasia (PIN) to prostate cancer: genome-wide gene-expression profiles of prostate cancers and PINs. *Cancer Res*, *64*(17), 5963-5972. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-0020
- Aspinall, J. O., Bentel, J. M., Horsfall, D. J., Haagensen, D. E., Marshall, V. R., & Tilley, W. D. (1995). Differential Expression of Apolipoprotein-D and Prostate Specific Antigen in Benign and Malignant Prostate Tissues. *Journal of Urology*, *154*(2), 622-628. doi:10.1016/s0022-5347(01)67123-4

- Aung, T., Halsey, J., Kromhout, D., Gerstein, H. C., Marchioli, R., Tavazzi, L., . . . Omega-3 Treatment Trialists, C. (2018). Associations of Omega-3 Fatty Acid Supplement Use With Cardiovascular Disease Risks: Meta-analysis of 10 Trials Involving 77917 Individuals. *JAMA Cardiol*, 3(3), 225-234. doi:10.1001/jamacardio.2017.5205
- Ayrault-Jarrier, M., Levy, G., Wald, R., & Polonovski, J. (1963). [Separation by ultracentrifugation of the alpha-lipoproteins of normal human serum]. *Bull Soc Chim Biol (Paris)*, 45, 349-359.
- Bai, H., Yang, B., Yu, W., Xiao, Y., Yu, D., & Zhang, Q. (2018). Cathepsin B links oxidative stress to the activation of NLRP3 inflammasome. *Exp Cell Res*, 362(1), 180-187. doi:10.1016/j.yexcr.2017.11.015
- Bai, Y., Huang, W., Ma, L. T., Jiang, J. L., & Chen, Z. N. (2014). Importance of N-glycosylation on CD147 for its biological functions. *Int J Mol Sci*, 15(4), 6356-6377. doi:10.3390/ijms15046356
- Baillie, A. G. S., Coburn, C. T., & Abumrad, N. A. (1996). Reversible Binding of Long-chain Fatty Acids to Purified FAT, the Adipose CD36 Homolog. *Journal of Membrane Biology*, 153(1), 75-81. doi:10.1007/s002329900111
- Bajo-Graneras, R., Ganfornina, M. D., Martin-Tejedor, E., & Sanchez, D. (2011). Apolipoprotein D mediates autocrine protection of astrocytes and controls their reactivity level, contributing to the functional maintenance of paraquat-challenged dopaminergic systems. *Glia*, 59(10), 1551-1566. doi:10.1002/glia.21200
- Baker, W. A., Hitman, G. A., Hawrami, K., McCarthy, M. I., Riikonen, A., Tuomilehto-Wolf, E., . . . et al. (1994). Apolipoprotein D gene polymorphism: a new genetic marker for type 2 diabetic subjects in Nauru and south India. *Diabet Med*, 11(10), 947-952. doi:10.1111/j.1464-5491.1994.tb00252.x
- Balbin, M., Freije, J. M., Fueyo, A., Sanchez, L. M., & Lopez-Otin, C. (1990). Apolipoprotein D is the major protein component in cyst fluid from women with human breast gross cystic disease. *Biochem J*, 271(3), 803-807. doi:10.1042/bj2710803
- Balbín, M., Freije, J. M., Fueyo, A., Sánchez, L. M., & López-Otín, C. (1990). Apolipoprotein D is the major protein component in cyst fluid from women with human gross cystic disease. *Biochem J*, 271, 803-807.
- Banks, W. A., Farr, S. A., & Morley, J. E. (2000). Permeability of the blood-brain barrier to albumin and insulin in the young and aged SAMP8 mouse. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 55(12), B601-606. doi:10.1093/gerona/55.12.b601
- Baothman, O. A., Zamzami, M. A., Taher, I., Abubaker, J., & Abu-Farha, M. (2016). The role of Gut Microbiota in the development of obesity and Diabetes. *Lipids Health Dis*, 15, 108. doi:10.1186/s12944-016-0278-4
- Barak, Y., Nelson, M. C., Ong, E. S., Jones, Y. Z., Ruiz-Lozano, P., Chien, K. R., . . . Evans, R. M. (1999). PPAR γ Is Required for Placental, Cardiac, and Adipose

- Tissue Development. *Molecular Cell*, 4(4), 585-595. doi:10.1016/s1097-2765(00)80209-9
- Bauernfeind, F. G., Horvath, G., Stutz, A., Alnemri, E. S., MacDonald, K., Speert, D., . . . Latz, E. (2009). Cutting edge: NF-kappaB activating pattern recognition and cytokine receptors license NLRP3 inflammasome activation by regulating NLRP3 expression. *J Immunol*, 183(2), 787-791. doi:10.4049/jimmunol.0901363
- Bazinet, R. P., & Laye, S. (2014). Polyunsaturated fatty acids and their metabolites in brain function and disease. *Nat Rev Neurosci*, 15(12), 771-785. doi:10.1038/nrn3820
- Bechmann, L. P., Hannivoort, R. A., Gerken, G., Hotamisligil, G. S., Trauner, M., & Canbay, A. (2012). The interaction of hepatic lipid and glucose metabolism in liver diseases. *J Hepatol*, 56(4), 952-964. doi:10.1016/j.jhep.2011.08.025
- Bécuwe, P., Bianchi, A., Didelot, C., Barberi-Heyob, M., & Dauça, M. (2003). Arachidonic acid activates a functional AP-1 and an inactive NF-κB complex in human HepG2 hepatoma cells. *Free Radical Biology and Medicine*, 35(6), 636-647. doi:10.1016/S0891-5849(03)00387-3
- Belizario, J. E., Fontes-Oliveira, C. C., Borges, J. P., Kashiabara, J. A., & Vannier, E. (2016). Skeletal muscle wasting and renewal: a pivotal role of myokine IL-6. *Springerplus*, 5, 619. doi:10.1186/s40064-016-2197-2
- Bell-Parikh, L. C., Ide, T., Lawson, J. A., McNamara, P., Reilly, M., & FitzGerald, G. A. (2003). Biosynthesis of 15-deoxy-Δ^{12,14}-PGJ₂ and the ligation of PPAR_γ. *Journal of Clinical Investigation*, 112(6), 945-955. doi:10.1172/jci200318012
- Bell, R. D., Sagare, A. P., Friedman, A. E., Bedi, G. S., Holtzman, D. M., Deane, R., & Zlokovic, B. V. (2007). Transport pathways for clearance of human Alzheimer's amyloid beta-peptide and apolipoproteins E and J in the mouse central nervous system. *J Cereb Blood Flow Metab*, 27(5), 909-918. doi:10.1038/sj.jcbfm.9600419
- Belloir, B., Kovari, E., Surini-Demiri, M., & Savioz, A. (2001). Altered apolipoprotein D expression in the brain of patients with Alzheimer disease. *J Neurosci Res*, 64(1), 61-69. doi:10.1002/jnr.1054
- Berg, A. H., & Scherer, P. E. (2005). Adipose tissue, inflammation, and cardiovascular disease. *Circ Res*, 96(9), 939-949. doi:10.1161/01.RES.0000163635.62927.34
- Bhatia, S., Jenner, A. M., Li, H., Ruberu, K., Spiro, A. S., Shepherd, C. E., . . . Garner, B. (2013). Increased apolipoprotein D dimer formation in Alzheimer's disease hippocampus is associated with lipid conjugated diene levels. *J Alzheimers Dis*, 35(3), 475-486. doi:10.3233/JAD-122278
- Bhatia, S., Kim, W. S., Shepherd, C. E., & Halliday, G. M. (2019). Apolipoprotein D Upregulation in Alzheimer's Disease but Not Frontotemporal Dementia. *J Mol Neurosci*, 67(1), 125-132. doi:10.1007/s12031-018-1217-9
- Bhatia, S., Knoch, B., Wong, J., Kim, W. S., Else, P. L., Oakley, A. J., & Garner, B. (2012). Selective reduction of hydroperoxyeicosatetraenoic acids to their

- hydroxy derivatives by apolipoprotein D: implications for lipid antioxidant activity and Alzheimer's disease. *Biochem J*, 442(3), 713-721. doi:10.1042/BJ20111166
- Bishop-Bailey, D., & Wray, J. (2003). Peroxisome proliferator-activated receptors: a critical review on endogenous pathways for ligand generation. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*, 71(1-2), 1-22. doi:10.1016/s0090-6980(03)00003-0
- Bishop, R. E., Penfold, S. S., Frost, L. S., Holtje, J. V., & Weiner, J. H. (1995). Stationary phase expression of a novel *Escherichia coli* outer membrane lipoprotein and its relationship with mammalian apolipoprotein D. Implications for the origin of lipocalins. *J Biol Chem*, 270(39), 23097-23103. doi:10.1074/jbc.270.39.23097
- Björntorp, P. (2000). Metabolic difference between visceral fat and subcutaneous abdominal fat. *Diabetes Metab*, 26 Suppl(3), 10-12.
- Blais, Y., Sugimoto, K., Carriere, M. C., Haagensen, D. E., Labrie, F., & Simard, J. (1994). Potent stimulatory effect of interleukin-1 alpha on apolipoprotein D and gross cystic disease fluid protein-15 expression in human breast-cancer cells. *Int J Cancer*, 59(3), 400-407. doi:10.1002/ijc.2910590319
- Blais, Y., Sugimoto, K., Carriere, M. C., Haagensen, D. E., Labrie, F., & Simard, J. (1995). Interleukin-6 inhibits the potent stimulatory action of androgens, glucocorticoids and interleukin-1 alpha on apolipoprotein D and GCDPF-15 expression in human breast cancer cells. *Int J Cancer*, 62(6), 732-737. doi:10.1002/ijc.2910620614
- Blanco-Vaca, F., & Pownall, H. J. (1993). Disulfide linked dimers of apolipoprotein D in urine. *Electrophoresis*, 14(10), 1086-1087. doi:10.1002/elps.11501401175
- Blanco-Vaca, F., Via, D. P., Yang, C. Y., Massey, J. B., & Pownall, H. J. (1992). Characterization of disulfide-linked heterodimers containing apolipoprotein D in human plasma lipoprotein. *J Lipid Res*, 33(12), 1785-1796.
- Blondeau, N., Lipsky, R. H., Bourourou, M., Duncan, M. W., Gorelick, P. B., & Marini, A. M. (2015). Alpha-linolenic acid: an omega-3 fatty acid with neuroprotective properties-ready for use in the stroke clinic? *Biomed Res Int*, 2015, 519830. doi:10.1155/2015/519830
- Bodzioch, M., Orso, E., Klucken, J., Langmann, T., Bottcher, A., Diederich, W., . . . Schmitz, G. (1999). The gene encoding ATP-binding cassette transporter 1 is mutated in Tangier disease. *Nat Genet*, 22(4), 347-351. doi:10.1038/11914
- Boer, S., Sanchez, D., Reinieren, I., van den Boom, T., Udawela, M., Scarr, E., . . . Dean, B. (2010). Decreased kainate receptors in the hippocampus of apolipoprotein D knockout mice. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 34(2), 271-278. doi:10.1016/j.pnpbp.2009.11.016
- Bonora, E. (2000). Relationship between regional fat distribution and insulin resistance. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 24 Suppl 2, S32-35. doi:10.1038/sj.ijo.0801274
- Borgeson, E., Johnson, A. M., Lee, Y. S., Till, A., Syed, G. H., Ali-Shah, S. T., . . . Godson, C. (2015). Lipoxin A4 Attenuates Obesity-Induced Adipose

- Inflammation and Associated Liver and Kidney Disease. *Cell Metab*, 22(1), 125-137. doi:10.1016/j.cmet.2015.05.003
- Bouchard, L., Vohl, M. C., Lebel, S., Hould, F. S., Marceau, P., Bergeron, J., . . . Mauriege, P. (2010). Contribution of genetic and metabolic syndrome to omental adipose tissue PAI-1 gene mRNA and plasma levels in obesity. *Obes Surg*, 20(4), 492-499. doi:10.1007/s11695-010-0079-1
- Bourdeau, I., Antonini, S. R., Lacroix, A., Kirschner, L. S., Matyakhina, L., Lorang, D., . . . Stratakis, C. A. (2004). Gene array analysis of macronodular adrenal hyperplasia confirms clinical heterogeneity and identifies several candidate genes as molecular mediators. *Oncogene*, 23(8), 1575-1585. doi:10.1038/sj.onc.1207277
- Boyles, J. K., Notterpek, L. M., & Anderson, L. J. (1990). Accumulation of apolipoproteins in the regenerating and remyelinating mammalian peripheral nerve. Identification of apolipoprotein D, apolipoprotein A-IV, apolipoprotein E, and apolipoprotein A-I. *J Biol Chem*, 265(29), 17805-17815.
- Boyles, J. K., Notterpek, L. M., Wardell, M. R., & Rall, S. C., Jr. (1990). Identification, characterization, and tissue distribution of apolipoprotein D in the rat. *J Lipid Res*, 31(12), 2243-2256.
- Boyles, J. K., Zoellner, C. D., Anderson, L. J., Kosik, L. M., Pitas, R. E., Weisgraber, K. H., . . . et al. (1989). A role for apolipoprotein E, apolipoprotein A-I, and low density lipoprotein receptors in cholesterol transport during regeneration and remyelination of the rat sciatic nerve. *J Clin Invest*, 83(3), 1015-1031. doi:10.1172/JCI113943
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72, 248-254. doi:10.1006/abio.1976.9999
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), 248-254. doi:10.1016/0003-2697(76)90527-3
- Bradley, W. G., Jr. (2015). CSF Flow in the Brain in the Context of Normal Pressure Hydrocephalus. *AJNR Am J Neuroradiol*, 36(5), 831-838. doi:10.3174/ajnr.A4124
- Braesch-Andersen, S., Beckman, L., Paulie, S., & Kumagai-Braesch, M. (2014). ApoD mediates binding of HDL to LDL and to growing T24 carcinoma. *PLoS One*, 9(12), e115180. doi:10.1371/journal.pone.0115180
- Brash, A. R. (2001). Arachidonic acid as a bioactive molecule. *J Clin Invest*, 107(11), 1339-1345. doi:10.1172/JCI13210
- Bray, G. A., & York, D. A. (1979). Hypothalamic and genetic obesity in experimental animals: an autonomic and endocrine hypothesis. *Physiol Rev*, 59(3), 719-809. doi:10.1152/physrev.1979.59.3.719

- Brennan, K., Martin, K., FitzGerald, S. P., O'Sullivan, J., Wu, Y., Blanco, A., . . . McGee, M. M. (2020). A comparison of methods for the isolation and separation of extracellular vesicles from protein and lipid particles in human serum. *Sci Rep*, *10*(1), 1039. doi:10.1038/s41598-020-57497-7
- Breustedt, D. A., Schonfeld, D. L., & Skerra, A. (2006). Comparative ligand-binding analysis of ten human lipocalins. *Biochim Biophys Acta*, *1764*(2), 161-173. doi:10.1016/j.bbapap.2005.12.006
- Brown, R. C., Morris, A. P., & O'Neil, R. G. (2007). Tight junction protein expression and barrier properties of immortalized mouse brain microvessel endothelial cells. *Brain Res*, *1130*(1), 17-30. doi:10.1016/j.brainres.2006.10.083
- Broz, P., & Dixit, V. M. (2016). Inflammasomes: mechanism of assembly, regulation and signalling. *Nat Rev Immunol*, *16*(7), 407-420. doi:10.1038/nri.2016.58
- Bruha, R., Vitek, L., & Smid, V. (2020). Osteopontin - A potential biomarker of advanced liver disease. *Ann Hepatol*, *19*(4), 344-352. doi:10.1016/j.aohep.2020.01.001
- Calabro, S. R., Maczurek, A. E., Morgan, A. J., Tu, T., Wen, V. W., Yee, C., . . . Shackel, N. A. (2014). Hepatocyte produced matrix metalloproteinases are regulated by CD147 in liver fibrogenesis. *PLoS One*, *9*(7), e90571. doi:10.1371/journal.pone.0090571
- Camato, R., Marcel, Y. L., Milne, R. W., Lussier-Cacan, S., & Weech, P. K. (1989). Protein polymorphism of a human plasma apolipoprotein D antigenic epitope. *J Lipid Res*, *30*(6), 865-875.
- Carpene, C., Les, F., Hasnaoui, M., Biron, S., Marceau, P., Richard, D., . . . Mauriege, P. (2016). Anatomical distribution of primary amine oxidase activity in four adipose depots and plasma of severely obese women with or without a dysmetabolic profile. *J Physiol Biochem*, *73*(3), 475-486. doi:10.1007/s13105-016-0526-0
- Caspar-Bauguil, S., Fioroni, A., Galinier, A., Allenbach, S., Pujol, M. C., Salvayre, R., . . . Mauriege, P. (2012). Pro-inflammatory phospholipid arachidonic acid/eicosapentaenoic acid ratio of dysmetabolic severely obese women. *Obes Surg*, *22*(6), 935-944. doi:10.1007/s11695-012-0633-0
- Castanon, N., Luheshi, G., & Laye, S. (2015). Role of neuroinflammation in the emotional and cognitive alterations displayed by animal models of obesity. *Front Neurosci*, *9*, 229. doi:10.3389/fnins.2015.00229
- Castro, A. M., Macedo-de la Concha, L. E., & Pantoja-Meléndez, C. A. (2017). Low-grade inflammation and its relation to obesity and chronic degenerative diseases. *Revista Médica del Hospital General de México*, *80*(2), 101-105. doi:10.1016/j.hgmx.2016.06.011
- Ceddia, R. P., Lee, D., Maulis, M. F., Carboneau, B. A., Threadgill, D. W., Poffenberger, G., . . . Breyer, R. M. (2016). The PGE2 EP3 Receptor Regulates Diet-Induced Adiposity in Male Mice. *Endocrinology*, *157*(1), 220-232. doi:10.1210/en.2015-1693

- Cerf, M. E. (2013). Beta cell dysfunction and insulin resistance. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 4, 37. doi:10.3389/fendo.2013.00037
- Cesari, M., Pahor, M., & Incalzi, R. A. (2010). Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1): a key factor linking fibrinolysis and age-related subclinical and clinical conditions. *Cardiovasc Ther*, 28(5), e72-91. doi:10.1111/j.1755-5922.2010.00171.x
- Chagnon, Y. C., Rankinen, T., Snyder, E. E., Weisnagel, S. J., Perusse, L., & Bouchard, C. (2003). The human obesity gene map: the 2002 update. *Obes Res*, 11(3), 313-367. doi:10.1038/oby.2003.47
- Chandrasekharan, J. A., & Sharma-Walia, N. (2015). Lipoxins: nature's way to resolve inflammation. *J Inflamm Res*, 8, 181-192. doi:10.2147/JIR.S90380
- Charron, J. B., Ouellet, F., Houde, M., & Sarhan, F. (2008). The plant Apolipoprotein D ortholog protects Arabidopsis against oxidative stress. *BMC Plant Biol*, 8, 86. doi:10.1186/1471-2229-8-86
- Chen, K., Li, J., Li, S., Feng, J., Wu, L., Liu, T., . . . Guo, C. (2016). 15d-PGJ2 alleviates ConA-induced acute liver injury in mice by up-regulating HO-1 and reducing hepatic cell autophagy. *Biomed Pharmacother*, 80, 183-192. doi:10.1016/j.biopha.2016.03.012
- Chen, Y., Liang, Z., Tian, Z., Blanchard, J., Dai, C. L., Chalbot, S., . . . Gong, C. X. (2014). Intracerebroventricular streptozotocin exacerbates Alzheimer-like changes of 3xTg-AD mice. *Mol Neurobiol*, 49(1), 547-562. doi:10.1007/s12035-013-8539-y
- Chen, Y. W., Gregory, C. M., Scarborough, M. T., Shi, R., Walter, G. A., & Vandeborne, K. (2007). Transcriptional pathways associated with skeletal muscle disuse atrophy in humans. *Physiol Genomics*, 31(3), 510-520. doi:10.1152/physiolgenomics.00115.2006
- Cheow, E. S., Cheng, W. C., Lee, C. N., de Kleijn, D., Sorokin, V., & Sze, S. K. (2016). Plasma-derived Extracellular Vesicles Contain Predictive Biomarkers and Potential Therapeutic Targets for Myocardial Ischemic (MI) Injury. *Mol Cell Proteomics*, 15(8), 2628-2640. doi:10.1074/mcp.M115.055731
- Cholongitas, E., Papatheodoridis, G. V., Vangeli, M., Terreni, N., Patch, D., & Burroughs, A. K. (2005). Systematic review: The model for end-stage liver disease--should it replace Child-Pugh's classification for assessing prognosis in cirrhosis? *Aliment Pharmacol Ther*, 22(11-12), 1079-1089. doi:10.1111/j.1365-2036.2005.02691.x
- Chooi, Y. C., Ding, C., & Magkos, F. (2019). The epidemiology of obesity. *Metabolism*, 92, 6-10. doi:10.1016/j.metabol.2018.09.005
- Ciapparelli, A., Dell'Osso, L., Bandettini di Poggio, A., Carmassi, C., Cecconi, D., Fenzi, M., . . . Cassano, G. B. (2003). Clozapine in treatment-resistant patients with schizophrenia, schizoaffective disorder, or psychotic bipolar disorder: a naturalistic 48-month follow-up study. *J Clin Psychiatry*, 64(4), 451-458. doi:10.4088/jcp.v64n0416

- Cichoż-Lach, H., & Michalak, A. (2014). Oxidative stress as a crucial factor in liver diseases. *World J Gastroenterol*, *20*(25), 8082-8091. doi:10.3748/wjg.v20.i25.8082
- Codagnone, M., Cianci, E., Lamolinara, A., Mari, V. C., Nespoli, A., Isopi, E., . . . Recchiuti, A. (2018). Resolvin D1 enhances the resolution of lung inflammation caused by long-term *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Mucosal Immunol*, *11*(1), 35-49. doi:10.1038/mi.2017.36
- Cofer, S., & Ross, S. R. (1996). The murine gene encoding apolipoprotein D exhibits a unique expression pattern as compared to other species. *Gene*, *171*(2), 261-263. doi:10.1016/0378-1119(96)00099-6
- Corton, J. C., Anderson, S. P., & Stauber, A. (2000). Central role of peroxisome proliferator-activated receptors in the actions of peroxisome proliferators. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, *40*, 491-518. doi:10.1146/annurev.pharmtox.40.1.491w
- Cosentino, F., Eto, M., De Paolis, P., van der Loo, B., Bachschmid, M., Ullrich, V., . . . Luscher, T. F. (2003). High glucose causes upregulation of cyclooxygenase-2 and alters prostanoid profile in human endothelial cells: role of protein kinase C and reactive oxygen species. *Circulation*, *107*(7), 1017-1023. doi:10.1161/01.cir.0000051367.92927.07
- Croasdell, A., Sime, P. J., & Phipps, R. P. (2016). Resolvin D2 decreases TLR4 expression to mediate resolution in human monocytes. *FASEB J*, *30*(9), 3181-3193. doi:10.1096/fj.201600375R
- Cullen, S. P., Kearney, C. J., Clancy, D. M., & Martin, S. J. (2015). Diverse Activators of the NLRP3 Inflammasome Promote IL-1beta Secretion by Triggering Necrosis. *Cell Rep*, *11*(10), 1535-1548. doi:10.1016/j.celrep.2015.05.003
- Cury, S. S., de Moraes, D., Freire, P. P., de Oliveira, G., Marques, D. V. P., Fernandez, G. J., . . . Carvalho, R. F. (2019). Tumor Transcriptome Reveals High Expression of IL-8 in Non-Small Cell Lung Cancer Patients with Low Pectoralis Muscle Area and Reduced Survival. *Cancers (Basel)*, *11*(9). doi:10.3390/cancers11091251
- Dalli, J., Ramon, S., Norris, P. C., Colas, R. A., & Serhan, C. N. (2015). Novel proresolving and tissue-regenerative resolvin and protectin sulfido-conjugated pathways. *FASEB J*, *29*(5), 2120-2136. doi:10.1096/fj.14-268441
- Dalli, J., & Serhan, C. N. (2017). Pro-Resolving Mediators in Regulating and Conferring Macrophage Function. *Front Immunol*, *8*, 1400. doi:10.3389/fimmu.2017.01400
- Dalli, J., & Serhan, C. N. (2018). Immunoresolvents signaling molecules at intersection between the brain and immune system. *Curr Opin Immunol*, *50*, 48-54. doi:10.1016/j.coi.2017.10.007
- Dalli, J., Vlasakov, I., Riley, I. R., Rodriguez, A. R., Spur, B. W., Petasis, N. A., . . . Serhan, C. N. (2016). Maresin conjugates in tissue regeneration biosynthesis

- enzymes in human macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 113(43), 12232-12237. doi:10.1073/pnas.1607003113
- Dalli, J., Zhu, M., Vlasenko, N. A., Deng, B., Haeggstrom, J. Z., Petasis, N. A., & Serhan, C. N. (2013). The novel 13S,14S-epoxy-maresin is converted by human macrophages to maresin 1 (MaR1), inhibits leukotriene A4 hydrolase (LTA4H), and shifts macrophage phenotype. *FASEB J*, 27(7), 2573-2583. doi:10.1096/fj.13-227728
- Darstein, M., Petralia, R. S., Swanson, G. T., Wenthold, R. J., & Heinemann, S. F. (2003). Distribution of Kainate Receptor Subunits at Hippocampal Mossy Fiber Synapses. *The Journal of Neuroscience*, 23(22), 8013-8019. doi:10.1523/jneurosci.23-22-08013.2003
- Dassati, S., Waldner, A., & Schweigreiter, R. (2014). Apolipoprotein D takes center stage in the stress response of the aging and degenerative brain. *Neurobiol Aging*, 35(7), 1632-1642. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2014.01.148
- Davis, M. J., Tsang, T. M., Qiu, Y., Dayrit, J. K., Freij, J. B., Huffnagle, G. B., & Olszewski, M. A. (2013). Macrophage M1/M2 polarization dynamically adapts to changes in cytokine microenvironments in *Cryptococcus neoformans* infection. *MBio*, 4(3), e00264-00213. doi:10.1128/mBio.00264-13
- de Leval, X., Delarge, J., Somers, F., de Tullio, P., Henrotin, Y., Pirotte, B., & Dogne, J.-M. (2000). Recent Advances in Inducible Cyclooxygenase (COX-2) Inhibition. *Current Medicinal Chemistry*, 7(10), 1041-1062. doi:10.2174/0929867003374417
- de Mello Coelho, V., Nguyen, D., Giri, B., Bunbury, A., Schaffer, E., & Taub, D. D. (2004). Quantitative differences in lipid raft components between murine CD4+ and CD8+ T cells. *BMC Immunol*, 5, 2. doi:10.1186/1471-2172-5-2
- Deane, R., Sagare, A., Hamm, K., Parisi, M., Lane, S., Finn, M. B., . . . Zlokovic, B. V. (2008). apoE isoform-specific disruption of amyloid beta peptide clearance from mouse brain. *J Clin Invest*, 118(12), 4002-4013. doi:10.1172/JCI36663
- del Valle, E., Navarro, A., Astudillo, A., & Tolia, J. (2003). Apolipoprotein D expression in human brain reactive astrocytes. *J Histochem Cytochem*, 51(10), 1285-1290. doi:10.1177/002215540305101005
- Deng, B., Wang, C. W., Arnardottir, H. H., Li, Y., Cheng, C. Y., Dalli, J., & Serhan, C. N. (2014). Maresin biosynthesis and identification of maresin 2, a new anti-inflammatory and pro-resolving mediator from human macrophages. *PLoS One*, 9(7), e102362. doi:10.1371/journal.pone.0102362
- Denning, G. M., Figard, P. H., Kaduce, T. L., & Spector, A. A. (1983). Role of triglycerides in endothelial cell arachidonic acid metabolism. *J Lipid Res*, 24(8), 993-1001.
- Desai, P. P., Ikonovic, M. D., Abrahamson, E. E., Hamilton, R. L., Isanski, B. A., Hope, C. E., . . . Kamboh, M. I. (2005). Apolipoprotein D is a component of compact but not diffuse amyloid-beta plaques in Alzheimer's disease temporal cortex. *Neurobiol Dis*, 20(2), 574-582. doi:10.1016/j.nbd.2005.04.012

- Desmarais, F., Bergeron, K.-F., Ntambi, J. M., Rassart, E., & Mounier, C. (2020). Fatty acid mediators and the inflammasome. In *Lipid Signaling and Metabolism* (pp. 197-221).
- Desmarais, F., Bergeron, K. F., Lacaille, M., Lemieux, I., Bergeron, J., Biron, S., . . . Mounier, C. (2018). High ApoD protein level in the round ligament fat depot of severely obese women is associated with an improved inflammatory profile. *Endocrine*, *61*(2), 248-257. doi:10.1007/s12020-018-1621-5
- Desmarais, F., Bergeron, K. F., Rassart, E., & Mounier, C. (2019). Apolipoprotein D overexpression alters hepatic prostaglandin and omega fatty acid metabolism during the development of a non-inflammatory hepatic steatosis. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*, *1864*(4), 522-531. doi:10.1016/j.bbalip.2019.01.001
- di Masi, A., Trezza, V., Leboffe, L., & Ascenzi, P. (2016). Human plasma lipocalins and serum albumin: Plasma alternative carriers? *J Control Release*, *228*, 191-205. doi:10.1016/j.jconrel.2016.02.049
- Diez-Itza, I., Vizoso, F., Merino, A. M., Sanchez, L. M., Tolivia, J., Fernandez, J., . . . Lopez-Otin, C. (1994). Expression and prognostic significance of apolipoprotein D in breast cancer. *Am J Pathol*, *144*(2), 310-320.
- Dilley, W. G., Haagensen, D. E., Cox, C. E., & Wells, S. A., Jr. (1990). Immunologic and steroid binding properties of the GCDFP-24 protein isolated from human breast gross cystic disease fluid. *Breast Cancer Res Treat*, *16*(3), 253-260. doi:10.1007/BF01806333
- Dinarello, C. A. (2009). Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annu Rev Immunol*, *27*, 519-550. doi:10.1146/annurev.immunol.021908.132612
- Dixon, L. J., Barnes, M., Tang, H., Pritchard, M. T., & Nagy, L. E. (2013). Kupffer cells in the liver. *Compr Physiol*, *3*(2), 785-797. doi:10.1002/cphy.c120026
- Do Carmo, S., Forest, J. C., Giguere, Y., Masse, A., Lafond, J., & Rassart, E. (2009). Modulation of Apolipoprotein D levels in human pregnancy and association with gestational weight gain. *Reprod Biol Endocrinol*, *7*, 92. doi:10.1186/1477-7827-7-92
- Do Carmo, S., Fournier, D., Mounier, C., & Rassart, E. (2009). Human apolipoprotein D overexpression in transgenic mice induces insulin resistance and alters lipid metabolism. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, *296*(4), E802-811. doi:10.1152/ajpendo.90725.2008
- Do Carmo, S., Jacomy, H., Talbot, P. J., & Rassart, E. (2008). Neuroprotective effect of apolipoprotein D against human coronavirus OC43-induced encephalitis in mice. *J Neurosci*, *28*(41), 10330-10338. doi:10.1523/JNEUROSCI.2644-08.2008
- Do Carmo, S., Levros, L. C., Jr., & Rassart, E. (2007). Modulation of apolipoprotein D expression and translocation under specific stress conditions. *Biochim Biophys Acta*, *1773*(6), 954-969. doi:10.1016/j.bbamcr.2007.03.007

- Do Carmo, S., Seguin, D., Milne, R., & Rassart, E. (2002). Modulation of apolipoprotein D and apolipoprotein E mRNA expression by growth arrest and identification of key elements in the promoter. *J Biol Chem*, *277*(7), 5514-5523. doi:10.1074/jbc.M105057200
- Donath, M. Y., & Shoelson, S. E. (2011). Type 2 diabetes as an inflammatory disease. *Nat Rev Immunol*, *11*(2), 98-107. doi:10.1038/nri2925
- Dong, T., Li, C., Wang, X., Dian, L., Zhang, X., Li, L., . . . Lei, X. (2015). Ainsliadimer A selectively inhibits IKKalpha/beta by covalently binding a conserved cysteine. *Nat Commun*, *6*, 6522. doi:10.1038/ncomms7522
- Dorris, S. L., & Peebles, R. S., Jr. (2012). PGI2 as a regulator of inflammatory diseases. *Mediators Inflamm*, *2012*, 926968. doi:10.1155/2012/926968
- Dowman, J. K., Tomlinson, J. W., & Newsome, P. N. (2010). Pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease. *QJM*, *103*(2), 71-83. doi:10.1093/qjmed/hcp158
- Drake, I., Sonestedt, E., Ericson, U., Wallstrom, P., & Orho-Melander, M. (2018). A Western dietary pattern is prospectively associated with cardio-metabolic traits and incidence of the metabolic syndrome. *Br J Nutr*, *119*(10), 1168-1176. doi:10.1017/S000711451800079X
- Drayna, D., Fielding, C., McLean, J., Baer, B., Castro, G., Chen, E., . . . et al. (1986). Cloning and expression of human apolipoprotein D cDNA. *J Biol Chem*, *261*(35), 16535-16539.
- Drayna, D. T., McLean, J. W., Wion, K. L., Trent, J. M., Drabkin, H. A., & Lawn, R. M. (1987). Human apolipoprotein D gene: gene sequence, chromosome localization, and homology to the alpha 2u-globulin superfamily. *DNA*, *6*(3), 199-204. doi:10.1089/dna.1987.6.199
- Duan, Y., Gross, R. A., & Sheu, S. S. (2007). Ca²⁺-dependent generation of mitochondrial reactive oxygen species serves as a signal for poly(ADP-ribose) polymerase-1 activation during glutamate excitotoxicity. *J Physiol*, *585*(Pt 3), 741-758. doi:10.1113/jphysiol.2007.145409
- Eberle, D., Hegarty, B., Bossard, P., Ferre, P., & Fufelle, F. (2004). SREBP transcription factors: master regulators of lipid homeostasis. *Biochimie*, *86*(11), 839-848. doi:10.1016/j.biochi.2004.09.018
- Eichinger, A., Nasreen, A., Kim, H. J., & Skerra, A. (2007). Structural insight into the dual ligand specificity and mode of high density lipoprotein association of apolipoprotein D. *J Biol Chem*, *282*(42), 31068-31075. doi:10.1074/jbc.M703552200
- Eigenmann, D. E., Xue, G., Kim, K. S., Moses, A. V., Hamburger, M., & Oufir, M. (2013). Comparative study of four immortalized human brain capillary endothelial cell lines, hCMEC/D3, hBMEC, TY10, and BB19, and optimization of culture conditions, for an in vitro blood-brain barrier model for drug permeability studies. *Fluids Barriers CNS*, *10*(1), 33. doi:10.1186/2045-8118-10-33

- El-Gendy, Z. A., El-Batran, S. A., Youssef, S., Ramadan, A., El Hotaby, W., Bakeer, R. M., & Ahmed, R. F. (2020). Hepatoprotective effect of Omega-3 PUFAs against acute paracetamol-induced hepatic injury confirmed by FTIR. *Hum Exp Toxicol*, 960327120954522. doi:10.1177/0960327120954522
- El-Haroun, H., Clarke, D. L., Deacon, K., Bradbury, D., Clayton, A., Sutcliffe, A., & Knox, A. J. (2008). IL-1beta, BK, and TGF-beta1 attenuate PGI2-mediated cAMP formation in human pulmonary artery smooth muscle cells by multiple mechanisms involving p38 MAP kinase and PKA. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 294(3), L553-562. doi:10.1152/ajplung.00044.2006
- Emken, E. A., Adlof, R. O., & Gulley, R. M. (1994). Dietary linoleic acid influences desaturation and acylation of deuterium-labeled linoleic and linolenic acids in young adult males. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism*, 1213(3), 277-288. doi:10.1016/0005-2760(94)00054-9
- Endemann, G., Stanton, L. W., Madden, K. S., Bryant, C. M., White, R. T., & Protter, A. A. (1993). CD36 Is a Receptor for Oxidized Low Density Lipoprotein. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*, 268(16), 11811-11816.
- Esser, N., L'Homme, L., De Roover, A., Kohnen, L., Scheen, A. J., Moutschen, M., . . . Paquot, N. (2013). Obesity phenotype is related to NLRP3 inflammasome activity and immunological profile of visceral adipose tissue. *Diabetologia*, 56(11), 2487-2497. doi:10.1007/s00125-013-3023-9
- Estadella, D., da Penha Oller do Nascimento, C. M., Oyama, L. M., Ribeiro, E. B., Damaso, A. R., & de Piano, A. (2013). Lipotoxicity: effects of dietary saturated and transfatty acids. *Mediators Inflamm*, 2013, 137579. doi:10.1155/2013/137579
- Falcetti, E., Flavell, D. M., Staels, B., Tinker, A., Haworth, S. G., & Clapp, L. H. (2007). IP receptor-dependent activation of PPARgamma by stable prostacyclin analogues. *Biochem Biophys Res Commun*, 360(4), 821-827. doi:10.1016/j.bbrc.2007.06.135
- Farrell, G. C., van Rooyen, D., Gan, L., & Chitturi, S. (2012). NASH is an Inflammatory Disorder: Pathogenic, Prognostic and Therapeutic Implications. *Gut Liver*, 6(2), 149-171. doi:10.5009/gnl.2012.6.2.149
- Feng, G., Mellor, R. H., Bernstein, M., Keller-Peck, C., Nguyen, Q. T., Wallace, M., . . . Sanes, J. R. (2000). Imaging Neuronal Subsets in Transgenic Mice Expressing Multiple Spectral Variants of GFP. *Neuron*, 28(1), 41-51. doi:10.1016/s0896-6273(00)00084-2
- Feng, H., Gu, J., Gou, F., Huang, W., Gao, C., Chen, G., . . . Xu, Y. (2016). High Glucose and Lipopolysaccharide Prime NLRP3 Inflammasome via ROS/TXNIP Pathway in Mesangial Cells. *J Diabetes Res*, 2016, 6973175. doi:10.1155/2016/6973175
- Fielding, P. E., & Fielding, C. J. (1980). A cholesteryl ester transfer complex in human plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 77(6), 3327-3330. doi:10.1073/pnas.77.6.3327

- Finneran, M. M., Gonzalez-Brown, V. M., Smith, D. D., Landon, M. B., & Rood, K. M. (2019). Obesity and laboratory aspirin resistance in high-risk pregnant women treated with low-dose aspirin. *Am J Obstet Gynecol*, *220*(4), 385 e381-385 e386. doi:10.1016/j.ajog.2019.01.222
- Fishman, J. B., Rubin, J. B., Handrahan, J. V., Connor, J. R., & Fine, R. E. (1987). Receptor-mediated transcytosis of transferrin across the blood-brain barrier. *J Neurosci Res*, *18*(2), 299-304. doi:10.1002/jnr.490180206
- Flower, D. R. (1996). The lipocalin protein family: structure and function. *Biochem J*, *318* (Pt 1), 1-14. doi:10.1042/bj3180001
- Folch, J., Etcheto, M., Petrov, D., Abad, S., Pedros, I., Marin, M., . . . Camins, A. (2015). Review of the advances in treatment for Alzheimer disease: Strategies for combating beta-amyloid protein. *Neurologia*. doi:10.1016/j.nrl.2015.03.012
- Fon Tacer, K., & Rozman, D. (2011). Nonalcoholic Fatty liver disease: focus on lipoprotein and lipid deregulation. *J Lipids*, *2011*, 783976. doi:10.1155/2011/783976
- Forman, B. M., Tontonoz, P., Chen, J., Brun, R. P., Spiegelman, B. M., & Evans, R. M. (1995). 15-Deoxy- Δ 12,14-Prostaglandin J2 is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR γ . *Cell*, *83*(5), 803-812. doi:10.1016/0092-8674(95)90193-0
- Franchi, L., Eigenbrod, T., & Nunez, G. (2009). Cutting edge: TNF-alpha mediates sensitization to ATP and silica via the NLRP3 inflammasome in the absence of microbial stimulation. *J Immunol*, *183*(2), 792-796. doi:10.4049/jimmunol.0900173
- Francone, O. L., Evangelista, L., & Fielding, C. J. (1993). Lecithin-cholesterol acyltransferase: effects of mutagenesis at N-linked oligosaccharide attachment sites on acyl acceptor specificity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism*, *1166*(2-3), 301-304. doi:10.1016/0005-2760(93)90110-u
- Frenette Charron, J.-B., Breton, G., Badawi, M., & Sarhan, F. (2002). Molecular and structural analyses of a novel temperature stress-induced lipocalin from wheat and Arabidopsis. *FEBS Letters*, *517*(1-3), 129-132. doi:10.1016/s0014-5793(02)02606-6
- Fried, S. K., & Ross, R. R. (2004). Biology of visceral adipose tissue. In G. A. Bray & C. Bouchard (Eds.), *Hand book of Obesity* (pp. 589-614). Baton Rouge, Louisiana, U. S. A.: MARCEL DEKKER, INC.
- Fritz, G., Grösch, S., Tomicic, M., & Kaina, B. (2003). APE/Ref-1 and the mammalian response to genotoxic stress. *Toxicology*, *193*(1-2), 67-78. doi:10.1016/s0300-483x(03)00290-7
- Fujimori, K., Aritake, K., Oishi, Y., Nagata, N., Maehara, T., Lazarus, M., & Urade, Y. (2019). L-PGDS-produced PGD2 in premature, but not in mature, adipocytes increases obesity and insulin resistance. *Sci Rep*, *9*(1), 1931. doi:10.1038/s41598-018-38453-y

- Fujimori, K., Aritake, K., & Urade, Y. (2007). A novel pathway to enhance adipocyte differentiation of 3T3-L1 cells by up-regulation of lipocalin-type prostaglandin D synthase mediated by liver X receptor-activated sterol regulatory element-binding protein-1c. *J Biol Chem*, 282(25), 18458-18466. doi:10.1074/jbc.M701141200
- Fujimori, K., Fujitani, Y., Kadoyama, K., Kumanogoh, H., Ishikawa, K., & Urade, Y. (2003). Regulation of lipocalin-type prostaglandin D synthase gene expression by Hes-1 through E-box and interleukin-1 beta via two NF-kappa B elements in rat leptomeningeal cells. *J Biol Chem*, 278(8), 6018-6026. doi:10.1074/jbc.M208288200
- Fujimori, K., Maruyama, T., Kamauchi, S., & Urade, Y. (2012). Activation of adipogenesis by lipocalin-type prostaglandin D synthase-generated Delta(1)(2)-PGJ(2) acting through PPARgamma-dependent and independent pathways. *Gene*, 505(1), 46-52. doi:10.1016/j.gene.2012.05.052
- Fujisaka, S., Usui, I., Bukhari, A., Ikutani, M., Oya, T., Kanatani, Y., . . . Tobe, K. (2009). Regulatory mechanisms for adipose tissue M1 and M2 macrophages in diet-induced obese mice. *Diabetes*, 58(11), 2574-2582. doi:10.2337/db08-1475
- Fujita, T., & Narumiya, S. (2016). Roles of hepatic stellate cells in liver inflammation: a new perspective. *Inflamm Regen*, 36, 1. doi:10.1186/s41232-016-0005-6
- Funk, C. D. (2001). Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science*, 294(5548), 1871-1875. doi:10.1126/science.294.5548.1871
- Furtado, D., Bjornmalm, M., Ayton, S., Bush, A. I., Kempe, K., & Caruso, F. (2018). Overcoming the Blood-Brain Barrier: The Role of Nanomaterials in Treating Neurological Diseases. *Adv Mater*, 30(46), e1801362. doi:10.1002/adma.201801362
- Ganformina, M. D., Do Carmo, S., Lora, J. M., Torres-Schumann, S., Vogel, M., Allhorn, M., . . . Sanchez, D. (2008). Apolipoprotein D is involved in the mechanisms regulating protection from oxidative stress. *Aging Cell*, 7(4), 506-515. doi:10.1111/j.1474-9726.2008.00395.x
- Ganformina, M. D., Do Carmo, S., Martinez, E., Tolia, J., Navarro, A., Rassart, E., & Sanchez, D. (2010). ApoD, a glia-derived apolipoprotein, is required for peripheral nerve functional integrity and a timely response to injury. *Glia*, 58(11), 1320-1334. doi:10.1002/glia.21010
- Ganformina, M. D., Sanchez, D., Pagano, A., Tonachini, L., Descalzi-Cancedda, F., & Martinez, S. (2005). Molecular characterization and developmental expression pattern of the chicken apolipoprotein D gene: implications for the evolution of vertebrate lipocalins. *Dev Dyn*, 232(1), 191-199. doi:10.1002/dvdy.20193
- Garcia-Alonso, V., Lopez-Vicario, C., Titos, E., Moran-Salvador, E., Gonzalez-Periz, A., Rius, B., . . . Claria, J. (2013). Coordinate functional regulation between microsomal prostaglandin E synthase-1 (mPGES-1) and peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) in the conversion of

- white-to-brown adipocytes. *J Biol Chem*, 288(39), 28230-28242. doi:10.1074/jbc.M113.468603
- Garcia-Alonso, V., Titos, E., Alcaraz-Quiles, J., Rius, B., Lopategi, A., Lopez-Vicario, C., . . . Claria, J. (2016). Prostaglandin E2 Exerts Multiple Regulatory Actions on Human Obese Adipose Tissue Remodeling, Inflammation, Adaptive Thermogenesis and Lipolysis. *PLoS One*, 11(4), e0153751. doi:10.1371/journal.pone.0153751
- Garcia-Mateo, N., Ganfornina, M. D., Montero, O., Gijon, M. A., Murphy, R. C., & Sanchez, D. (2014). Schwann cell-derived Apolipoprotein D controls the dynamics of post-injury myelin recognition and degradation. *Front Cell Neurosci*, 8, 374. doi:10.3389/fncel.2014.00374
- Garcia-Mateo, N., Pascua-Maestro, R., Perez-Castellanos, A., Lillo, C., Sanchez, D., & Ganfornina, M. D. (2018). Myelin extracellular leaflet compaction requires apolipoprotein D membrane management to optimize lysosomal-dependent recycling and glycocalyx removal. *Glia*, 66(3), 670-687. doi:10.1002/glia.23274
- Gelinas, R., Thompson-Legault, J., Bouchard, B., Daneault, C., Mansour, A., Gillis, M. A., . . . Des Rosiers, C. (2011). Prolonged QT interval and lipid alterations beyond beta-oxidation in very long-chain acyl-CoA dehydrogenase null mouse hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 301(3), H813-823. doi:10.1152/ajpheart.01275.2010
- Gentile, C. L., & Pagliassotti, M. J. (2008). The role of fatty acids in the development and progression of nonalcoholic fatty liver disease. *J Nutr Biochem*, 19(9), 567-576. doi:10.1016/j.jnutbio.2007.10.001
- Ghonime, M. G., Shamaa, O. R., Das, S., Eldomany, R. A., Fernandes-Alnemri, T., Alnemri, E. S., . . . Wewers, M. D. (2014). Inflammasome priming by lipopolysaccharide is dependent upon ERK signaling and proteasome function. *J Immunol*, 192(8), 3881-3888. doi:10.4049/jimmunol.1301974
- Giachelli, C. M., Liaw, L., Murry, C. E., Schwartz, S. M., & Almeida, M. (1995). Osteopontin expression in cardiovascular diseases. *Ann NY Acad Sci*, 760, 109-126. doi:10.1111/j.1749-6632.1995.tb44624.x
- Gijon, M. A., & Leslie, C. C. (1999). Regulation of arachidonic acid release and cytosolic phospholipase A2 activation. *J Leukoc Biol*, 65(3), 330-336. doi:10.1002/jlb.65.3.330
- Glöckner, F., & Ohm, T. G. (2003). Hippocampal apolipoprotein D level depends on Braak stage and APOE genotype. *Neuroscience*, 122(1), 103-110. doi:10.1016/s0306-4522(03)00529-3
- Glushakova, O., Kosugi, T., Roncal, C., Mu, W., Heinig, M., Cirillo, P., . . . Nakagawa, T. (2008). Fructose induces the inflammatory molecule ICAM-1 in endothelial cells. *J Am Soc Nephrol*, 19(9), 1712-1720. doi:10.1681/ASN.2007121304

- Goessling, W., & Zucker, S. D. (2000). Role of apolipoprotein D in the transport of bilirubin in plasma. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 279(2), G356-365. doi:10.1152/ajpgi.2000.279.2.G356
- Gombault, A., Baron, L., & Couillin, I. (2012). ATP release and purinergic signaling in NLRP3 inflammasome activation. *Front Immunol*, 3, 414. doi:10.3389/fimmu.2012.00414
- Gonzalez-Muniesa, P., Martinez-Gonzalez, M. A., Hu, F. B., Despres, J. P., Matsuzawa, Y., Loos, R. J. F., . . . Martinez, J. A. (2017). Obesity. *Nat Rev Dis Primers*, 3, 17034. doi:10.1038/nrdp.2017.34
- Gonzalez-Periz, A., Planaguma, A., Gronert, K., Miquel, R., Lopez-Parra, M., Titos, E., . . . Claria, J. (2006). Docosahexaenoic acid (DHA) blunts liver injury by conversion to protective lipid mediators: protectin D1 and 17S-hydroxy-DHA. *FASEB J*, 20(14), 2537-2539. doi:10.1096/fj.06-6250fje
- Gravallese, E. M. (2003). Osteopontin: a bridge between bone and the immune system. *J Clin Invest*, 112(2), 147-149. doi:10.1172/JCI19190
- Gregg, S. Q., Gutierrez, V., Robinson, A. R., Woodell, T., Nakao, A., Ross, M. A., . . . Niedernhofer, L. J. (2012). A mouse model of accelerated liver aging caused by a defect in DNA repair. *Hepatology*, 55(2), 609-621. doi:10.1002/hep.24713
- Griffin, G. E., & Goldspink, G. (1973). The increase in skeletal muscle mass in male and female mice. *Anat Rec*, 177(3), 465-469. doi:10.1002/ar.1091770311
- Groslambert, M., & Py, B. F. (2018). Spotlight on the NLRP3 inflammasome pathway. *J Inflamm Res*, 11, 359-374. doi:10.2147/JIR.S141220
- Group, A. S. C., Bowman, L., Mafham, M., Wallendszus, K., Stevens, W., Buck, G., . . . Armitage, J. (2018). Effects of n-3 Fatty Acid Supplements in Diabetes Mellitus. *N Engl J Med*, 379(16), 1540-1550. doi:10.1056/NEJMoa1804989
- Grygiel-Gorniak, B. (2014). Peroxisome proliferator-activated receptors and their ligands: nutritional and clinical implications--a review. *Nutr J*, 13, 17. doi:10.1186/1475-2891-13-17
- Guillou, H., Zadavec, D., Martin, P. G., & Jacobsson, A. (2010). The key roles of elongases and desaturases in mammalian fatty acid metabolism: Insights from transgenic mice. *Prog Lipid Res*, 49(2), 186-199. doi:10.1016/j.plipres.2009.12.002
- Guo, Y. P., Jiang, H. K., Jiang, H., Tian, H. Y., & Li, L. (2018). Lipoxin A4 may attenuate the progression of obesity-related glomerulopathy by inhibiting NF-kappaB and ERK/p38 MAPK-dependent inflammation. *Life Sci*, 198, 112-118. doi:10.1016/j.lfs.2018.02.039
- Gutierrez, L. L., Maslinkiewicz, A., Curi, R., & de Bittencourt, P. I., Jr. (2008). Atherosclerosis: a redox-sensitive lipid imbalance suppressible by cyclopentenone prostaglandins. *Biochem Pharmacol*, 75(12), 2245-2262. doi:10.1016/j.bcp.2008.03.002
- Haeryfar, S. M., & Hoskin, D. W. (2004). Thy-1: more than a mouse pan-T cell marker. *J Immunol*, 173(6), 3581-3588. doi:10.4049/jimmunol.173.6.3581

- Hall, R. E., Horsfall, D. J., Stahl, J., Vivekanandan, S., Ricciardelli, C., Stapleton, A. M., . . . Tilley, W. D. (2004). Apolipoprotein-D: a novel cellular marker for HGPIN and prostate cancer. *Prostate*, *58*(2), 103-108. doi:10.1002/pros.10343
- Han, S. J., Choi, S. E., Yi, S. A., Jung, J. G., Jung, I. R., Shin, M., . . . Kang, Y. (2016). Glutamate dehydrogenase activator BCH stimulating reductive amination prevents high fat/high fructose diet-induced steatohepatitis and hyperglycemia in C57BL/6J mice. *Sci Rep*, *5*, 37468. doi:10.1038/srep37468
- Han, Y. H., Shin, K. O., Kim, J. Y., Khadka, D. B., Kim, H. J., Lee, Y. M., . . . Lee, M. O. (2019). A maresin 1/ROR α /12-lipoxygenase autoregulatory circuit prevents inflammation and progression of nonalcoholic steatohepatitis. *J Clin Invest*, *130*, 1684-1698. doi:10.1172/JCI124219
- Handoko, K., Yang, K., Strutt, B., Khalil, W., & Killinger, D. (2000). Insulin attenuates the stimulatory effects of tumor necrosis factor α on 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase 1 in human adipose stromal cells. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, *72*(3-4), 163-168. doi:10.1016/s0960-0760(00)00029-7
- Hansen, L., Gaster, M., Oakeley, E. J., Brusgaard, K., Damsgaard Nielsen, E. M., Beck-Nielsen, H., . . . Hemmings, B. A. (2004). Expression profiling of insulin action in human myotubes: induction of inflammatory and pro-angiogenic pathways in relationship with glycogen synthesis and type 2 diabetes. *Biochem Biophys Res Commun*, *323*(2), 685-695. doi:10.1016/j.bbrc.2004.08.146
- Harbeck, N., Penault-Llorca, F., Cortes, J., Gnant, M., Houssami, N., Poortmans, P., . . . Cardoso, F. (2019). Breast cancer. *Nat Rev Dis Primers*, *5*(1), 66. doi:10.1038/s41572-019-0111-2
- Harkins, J. M., Moustaid-Moussa, N., Chung, Y. J., Penner, K. M., Pestka, J. J., North, C. M., & Claycombe, K. J. (2004). Expression of interleukin-6 is greater in preadipocytes than in adipocytes of 3T3-L1 cells and C57BL/6J and ob/ob mice. *J Nutr*, *134*(10), 2673-2677. doi:10.1093/jn/134.10.2673
- Harkness, J., & Wagner, J. (1989). Biology and husbandry. In J. Harkness & J. Wagner (Eds.), *The biology and medicine of rabbits and rodents* (pp. 372). Philadelphia: Lea & Febiger.
- Harper, K. A., & Tyson-Capper, A. J. (2008). Complexity of COX-2 gene regulation. *Biochem Soc Trans*, *36*(Pt 3), 543-545. doi:10.1042/BST0360543
- Harris, R. B., Zhou, J., Redmann, S. M., Jr., Smagin, G. N., Smith, S. R., Rodgers, E., & Zachwieja, J. J. (1998). A leptin dose-response study in obese (ob/ob) and lean (+/?) mice. *Endocrinology*, *139*(1), 8-19. doi:10.1210/endo.139.1.5675
- Hashem, L., Swedrowska, M., & Vllasaliu, D. (2018). Intestinal uptake and transport of albumin nanoparticles: potential for oral delivery. *Nanomedicine (Lond)*, *13*(11), 1255-1265. doi:10.2217/nnm-2018-0029
- Hashimoto, K., Ethridge, R. T., Saito, H., Rajaraman, S., & Evers, B. M. (2003). The PPAR γ Ligand, 15d-PGJ₂, Attenuates the Severity of Cerulein-Induced Acute Pancreatitis. *Pancreas*, *27*(1), 58-66. doi:10.1097/00006676-200307000-00009

- He, X., Jittiwat, J., Kim, J. H., Jenner, A. M., Farooqui, A. A., Patel, S. C., & Ong, W. Y. (2009). Apolipoprotein D modulates F2-isoprostane and 7-ketocholesterol formation and has a neuroprotective effect on organotypic hippocampal cultures after kainate-induced excitotoxic injury. *Neurosci Lett*, *455*(3), 183-186. doi:10.1016/j.neulet.2009.03.038
- He, Y., Hara, H., & Nunez, G. (2016). Mechanism and Regulation of NLRP3 Inflammasome Activation. *Trends Biochem Sci*, *41*(12), 1012-1021. doi:10.1016/j.tibs.2016.09.002
- He, Y., Zeng, M. Y., Yang, D., Motro, B., & Nunez, G. (2016). NEK7 is an essential mediator of NLRP3 activation downstream of potassium efflux. *Nature*, *530*(7590), 354-357. doi:10.1038/nature16959
- Helms, H. C., Abbott, N. J., Burek, M., Cecchelli, R., Couraud, P. O., Deli, M. A., . . . Brodin, B. (2016). In vitro models of the blood-brain barrier: An overview of commonly used brain endothelial cell culture models and guidelines for their use. *J Cereb Blood Flow Metab*, *36*(5), 862-890. doi:10.1177/0271678X16630991
- Henderson, V. W., & Finch, C. E. (1989). The neurobiology of Alzheimer's disease. *J Neurosurg*, *70*(3), 335-353. doi:10.3171/jns.1989.70.3.0335
- Henkel, A., & Green, R. M. (2013). The unfolded protein response in fatty liver disease. *Semin Liver Dis*, *33*(4), 321-329. doi:10.1055/s-0033-1358522
- Henkel, J., Coleman, C. D., Schraplau, A., Johrens, K., Weiss, T. S., Jonas, W., . . . Puschel, G. P. (2018). Augmented liver inflammation in a microsomal prostaglandin E synthase 1 (mPGES-1)-deficient diet-induced mouse NASH model. *Sci Rep*, *8*(1), 16127. doi:10.1038/s41598-018-34633-y
- Henkel, J., Frede, K., Schanze, N., Vogel, H., Schurmann, A., Spruss, A., . . . Puschel, G. P. (2012). Stimulation of fat accumulation in hepatocytes by PGE(2)-dependent repression of hepatic lipolysis, beta-oxidation and VLDL-synthesis. *Lab Invest*, *92*(11), 1597-1606. doi:10.1038/labinvest.2012.128
- Herder, C., Dalmas, E., Boni-Schnetzler, M., & Donath, M. Y. (2015). The IL-1 Pathway in Type 2 Diabetes and Cardiovascular Complications. *Trends Endocrinol Metab*, *26*(10), 551-563. doi:10.1016/j.tem.2015.08.001
- Hetherington, A. M., Sawyez, C. G., Zilberman, E., Stoianov, A. M., Robson, D. L., & Borradaile, N. M. (2016). Differential Lipotoxic Effects of Palmitate and Oleate in Activated Human Hepatic Stellate Cells and Epithelial Hepatoma Cells. *Cell Physiol Biochem*, *39*(4), 1648-1662. doi:10.1159/000447866
- Hill, J. O., Wyatt, H. R., & Peters, J. C. (2012). Energy balance and obesity. *Circulation*, *126*(1), 126-132. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.111.087213
- Hollenbach, P. W., Zilli, D. L., & Laster, S. M. (1992). Inhibitors of transcription and translation act synergistically with tumor necrosis factor to cause the activation of phospholipase A2. *J Biol Chem*, *267*(1), 39-42.
- Holzfeind, P., Merschak, P., Dieplinger, H., & Redl, B. (1995). The human lacrimal gland synthesizes apolipoprotein D mRNA in addition to tear prealbumin

- mRNA, both species encoding members of the lipocalin superfamily. *Experimental Eye Research*, 61(4), 495-500. doi:10.1016/s0014-4835(05)80145-9
- Homem de Bittencourt, P. I., Jr., Lagranha, D. J., Maslinkiewicz, A., Senna, S. M., Tavares, A. M., Baldissera, L. P., . . . Curi, R. (2007). LipoCardium: endothelium-directed cyclopentenone prostaglandin-based liposome formulation that completely reverses atherosclerotic lesions. *Atherosclerosis*, 193(2), 245-258. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2006.08.049
- Hong, S., Lu, Y., Tian, H., Alapure, B. V., Wang, Q., Bunnell, B. A., & Laborde, J. M. (2014). Maresin-like lipid mediators are produced by leukocytes and platelets and rescue reparative function of diabetes-impaired macrophages. *Chem Biol*, 21(10), 1318-1329. doi:10.1016/j.chembiol.2014.06.010
- Horrobin, D. F. (1998). The membrane phospholipid hypothesis as a biochemical basis for the neurodevelopmental concept of schizophrenia. *Schizophrenia Research*, 30(3), 193-208. doi:10.1016/s0920-9964(97)00151-5
- Horton, J. D., Goldstein, J. L., & Brown, M. S. (2002). SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J Clin Invest*, 109(9), 1125-1131. doi:10.1172/JCI15593
- Hotamisligil, G. S. (2017). Inflammation, metaflammation and immunometabolic disorders. *Nature*, 542(7640), 177-185. doi:10.1038/nature21363
- Hu, B., Elinav, E., Huber, S., Strowig, T., Hao, L., Hafemann, A., . . . Flavell, R. A. (2013). Microbiota-induced activation of epithelial IL-6 signaling links inflammasome-driven inflammation with transmissible cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110(24), 9862-9867. doi:10.1073/pnas.1307575110
- Hu, C. Y., Ong, W. Y., Sundaram, R. K., Chan, C., & Patel, S. C. (2001). Immunocytochemical localization of apolipoprotein D in oligodendrocyte precursor-like cells, perivascular cells, and pericytes in the human cerebral cortex. *J Neurocytol*, 30(3), 209-218. doi:10.1023/a:1012797623620
- Hua, K. F., Chou, J. C., Ka, S. M., Tasi, Y. L., Chen, A., Wu, S. H., . . . Lin, C. H. (2015). Cyclooxygenase-2 regulates NLRP3 inflammasome-derived IL-1beta production. *J Cell Physiol*, 230(4), 863-874. doi:10.1002/jcp.24815
- Hughes, M. M., & O'Neill, L. A. J. (2018). Metabolic regulation of NLRP3. *Immunol Rev*, 281(1), 88-98. doi:10.1111/imr.12608
- Hull-Thompson, J., Muffat, J., Sanchez, D., Walker, D. W., Benzer, S., Ganfornina, M. D., & Jasper, H. (2009). Control of metabolic homeostasis by stress signaling is mediated by the lipocalin NLaz. *PLoS Genet*, 5(4), e1000460. doi:10.1371/journal.pgen.1000460
- Hummasti, S., Laffitte, B. A., Watson, M. A., Galardi, C., Chao, L. C., Ramamurthy, L., . . . Tontonoz, P. (2004). Liver X receptors are regulators of adipocyte gene expression but not differentiation: identification of apoD as a direct target. *J Lipid Res*, 45(4), 616-625. doi:10.1194/jlr.M300312-JLR200

- Hunter, S., Young, A., Olson, J., Brat, D. J., Bowers, G., Wilcox, J. N., . . . Neish, A. (2002). Differential expression between pilocytic and anaplastic astrocytomas: identification of apolipoprotein D as a marker for low-grade, non-infiltrating primary CNS neoplasms. *J Neuropathol Exp Neurol*, *61*(3), 275-281. doi:10.1093/jnen/61.3.275
- Husted, K. S., & Bouzinova, E. V. (2016). The importance of n-6/n-3 fatty acids ratio in the major depressive disorder. *Medicina (Kaunas)*, *52*(3), 139-147. doi:10.1016/j.medici.2016.05.003
- Iacobuzio-Donahue, C. A., Ryu, B., Hruban, R. H., & Kern, S. E. (2002). Exploring the Host Desmoplastic Response to Pancreatic Carcinoma. *The American Journal of Pathology*, *160*(1), 91-99. doi:10.1016/s0002-9440(10)64353-2
- Iacono, K. T., Brown, A. L., Greene, M. I., & Saouaf, S. J. (2007). CD147 immunoglobulin superfamily receptor function and role in pathology. *Exp Mol Pathol*, *83*(3), 283-295. doi:10.1016/j.yexmp.2007.08.014
- Ibrahim, M. M. (2010). Subcutaneous and visceral adipose tissue: structural and functional differences. *Obes Rev*, *11*(1), 11-18. doi:10.1111/j.1467-789X.2009.00623.x
- Identification of top food sources of various dietary components. (2018, 2018-04-20). *Table 4. Food sources of arachidonic acid (PFA 20:4), listed in descending order by percentages of their contribution to intake, based on data from the National Health and Nutrition Examination Survey 2005-2006.* Retrieved from https://epi.grants.cancer.gov/diet/foodsources/fatty_acids/table4.html
- Igakura, T., Kadomatsu, K., Kaname, T., Muramatsu, H., Fan, Q. W., Miyauchi, T., . . . Muramatsu, T. (1998). A null mutation in basigin, an immunoglobulin superfamily member, indicates its important roles in peri-implantation development and spermatogenesis. *Dev Biol*, *194*(2), 152-165. doi:10.1006/dbio.1997.8819
- Ishizuka, T., Sawada, S., Sugama, K., & Kurita, A. (2000). Thromboxane A2 (TXA2) receptor blockade suppresses monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) expression by stimulated vascular endothelial cells. *Clinical and Experimental Immunology*, *120*(1), 71-78. doi:10.1046/j.1365-2249.2000.01169.x
- Iyer, S. S., Pulsikens, W. P., Sadler, J. J., Butter, L. M., Teske, G. J., Ulland, T. K., . . . Sutterwala, F. S. (2009). Necrotic cells trigger a sterile inflammatory response through the Nlrp3 inflammasome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *106*(48), 20388-20393. doi:10.1073/pnas.0908698106
- Jacomy, H., & Talbot, P. J. (2003). Vacuolating encephalitis in mice infected by human coronavirus OC43. *Virology*, *315*(1), 20-33. doi:10.1016/s0042-6822(03)00323-4
- Jager, J., Gremeaux, T., Cormont, M., Le Marchand-Brustel, Y., & Tanti, J. F. (2007). Interleukin-1beta-induced insulin resistance in adipocytes through down-regulation of insulin receptor substrate-1 expression. *Endocrinology*, *148*(1), 241-251. doi:10.1210/en.2006-0692

- Jankovic-Karasoulos, T., Bianco-Miotto, T., Butler, M. S., Butler, L. M., McNeil, C. M., O'Toole, S. A., . . . Ricciardelli, C. (2020). Elevated levels of tumor apolipoprotein-D independently predict poor outcome in breast cancer patients. *Histopathology*. doi:10.1111/his.14081
- Jansen, P. J., Lutjohann, D., Thelen, K. M., von Bergmann, K., van Leuven, F., Ramaekers, F. C., & Monique, M. (2009). Absence of ApoE upregulates murine brain ApoD and ABCA1 levels, but does not affect brain sterol levels, while human ApoE3 and human ApoE4 upregulate brain cholesterol precursor levels. *J Alzheimers Dis*, *18*(2), 319-329. doi:10.3233/JAD-2009-1150
- Jenkins, N., Parekh, R. B., & James, D. C. (1996). Getting the glycosylation right: implications for the biotechnology industry. *Nat Biotechnol*, *14*(8), 975-981. doi:10.1038/nbt0896-975
- Jenkins, S. J., Ruckerl, D., Cook, P. C., Jones, L. H., Finkelman, F. D., van Rooijen, N., . . . Allen, J. E. (2011). Local macrophage proliferation, rather than recruitment from the blood, is a signature of TH2 inflammation. *Science*, *332*(6035), 1284-1288. doi:10.1126/science.1204351
- Jensen, M. D., Ryan, D. H., Apovian, C. M., Ard, J. D., Comuzzie, A. G., Donato, K. A., . . . Yanovski, S. Z. (2014). 2013 AHA/ACC/TOS Guideline for the Management of Overweight and Obesity in Adults. *Circulation*, *129*(25 suppl 2), S102-S138. doi:10.1161/01.cir.0000437739.71477.ee
- Jessen, N. A., Munk, A. S., Lundgaard, I., & Nedergaard, M. (2015). The Glymphatic System: A Beginner's Guide. *Neurochem Res*, *40*(12), 2583-2599. doi:10.1007/s11064-015-1581-6
- Jiang, R., Rong, C., Ke, R., Meng, S., Yan, X., Ke, H., & Wu, S. (2019). Differential proteomic analysis of serum exosomes reveals alterations in progression of Parkinson disease. *Medicine (Baltimore)*, *98*(41), e17478. doi:10.1097/MD.00000000000017478
- Jimenez-Palomares, M., Cozar-Castellano, I., Ganfornina, M. D., Sanchez, D., & Perdomo, G. (2011). Genetic deficiency of apolipoprotein D in the mouse is associated with nonfasting hypertriglyceridemia and hyperinsulinemia. *Metabolism*, *60*(12), 1767-1774. doi:10.1016/j.metabol.2011.04.013
- Jin, D., El-Tanani, M., & Campbell, F. (2006). Identification of apolipoprotein D as a novel inhibitor of osteopontin-induced neoplastic transformation. *International Journal of Oncology*. doi:10.3892/ijo.29.6.1591
- Jones, H. M., & Pilowsky, L. S. (2002). Dopamine and antipsychotic drug action revisited. *Br J Psychiatry*, *181*, 271-275. doi:10.1192/bjp.181.4.271
- Joshi, H., Vastrad, B., Joshi, N., Vastrad, C., Tengli, A., & Kotturshetti, I. (2021). Identification of Key Pathways and Genes in Obesity Using Bioinformatics Analysis and Molecular Docking Studies. *Frontiers in Endocrinology*, *12*. doi:10.3389/fendo.2021.628907
- Jump, D. B. (2002). The biochemistry of n-3 polyunsaturated fatty acids. *J Biol Chem*, *277*(11), 8755-8758. doi:10.1074/jbc.R100062200

- Jurets, A., Le Bras, M., Staffler, G., Stein, G., Leitner, L., Neuhofer, A., . . . Stulnig, T. M. (2016). Inhibition of Cellular Adhesion by Immunological Targeting of Osteopontin Neoepitopes Generated through Matrix Metalloproteinase and Thrombin Cleavage. *PLoS One*, *11*(2), e0148333. doi:10.1371/journal.pone.0148333
- Kalinski, P. (2012). Regulation of immune responses by prostaglandin E2. *J Immunol*, *188*(1), 21-28. doi:10.4049/jimmunol.1101029
- Kalman, J., McConathy, W., Araoz, C., Kasa, P., & Lacko, A. G. (2000). Apolipoprotein D in the aging brain and in Alzheimer's dementia. *Neurol Res*, *22*(4), 330-336. doi:10.1080/01616412.2000.11740678
- Kang, J. X. (2007). Fat-1 transgenic mice: a new model for omega-3 research. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, *77*(5-6), 263-267. doi:10.1016/j.plefa.2007.10.010
- Kanneganti, T. D., & Dixit, V. D. (2012). Immunological complications of obesity. *Nat Immunol*, *13*(8), 707-712. doi:10.1038/ni.2343
- Kao, L. C., Tulac, S., Lobo, S., Imani, B., Yang, J. P., Germeyer, A., . . . Giudice, L. C. (2002). Global gene profiling in human endometrium during the window of implantation. *Endocrinology*, *143*(6), 2119-2138. doi:10.1210/endo.143.6.8885
- Karasawa, T., Kawashima, A., Usui-Kawanishi, F., Watanabe, S., Kimura, H., Kamata, R., . . . Takahashi, M. (2018). Saturated Fatty Acids Undergo Intracellular Crystallization and Activate the NLRP3 Inflammasome in Macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, *38*(4), 744-756. doi:10.1161/ATVBAHA.117.310581
- Karasawa, T., & Takahashi, M. (2017). Role of NLRP3 Inflammasomes in Atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb*, *24*(5), 443-451. doi:10.5551/jat.RV17001
- Katakura, M., Hashimoto, M., Inoue, T., Mamun, A. A., Tanabe, Y., Arita, M., & Shido, O. (2015). Chronic Arachidonic Acid Administration Decreases Docosahexaenoic Acid- and Eicosapentaenoic Acid-Derived Metabolites in Kidneys of Aged Rats. *PLoS One*, *10*(10), e0140884. doi:10.1371/journal.pone.0140884
- Katsumata, L. W., Miyajima, A., & Itoh, T. (2017). Portal fibroblasts marked by the surface antigen Thy1 contribute to fibrosis in mouse models of cholestatic liver injury. *Hepatol Commun*, *1*(3), 198-214. doi:10.1002/hep4.1023
- Kattoor, A. J., Pothineni, N. V. K., Palagiri, D., & Mehta, J. L. (2017). Oxidative Stress in Atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep*, *19*(11), 42. doi:10.1007/s11883-017-0678-6
- Katz, A., Nambi, S. S., Mather, K., Baron, A. D., Follmann, D. A., Sullivan, G., & Quon, M. J. (2000). Quantitative insulin sensitivity check index: a simple, accurate method for assessing insulin sensitivity in humans. *J Clin Endocrinol Metab*, *85*(7), 2402-2410. doi:10.1210/jcem.85.7.6661

- Kaviarasan, S., Muniandy, S., Qvist, R., & Ismail, I. S. (2009). F(2)-isoprostanes as novel biomarkers for type 2 diabetes: a review. *J Clin Biochem Nutr*, 45(1), 1-8. doi:10.3164/jcbtn.08-266
- Kawahara, K., Hohjoh, H., Inazumi, T., Tsuchiya, S., & Sugimoto, Y. (2015). Prostaglandin E2-induced inflammation: Relevance of prostaglandin E receptors. *Biochim Biophys Acta*, 1851(4), 414-421. doi:10.1016/j.bbali.2014.07.008
- Kelley, D. S., Taylor, P. C., Nelson, G. J., & Mackey, B. E. (1998). Arachidonic acid supplementation enhances synthesis of eicosanoids without suppressing immune functions in young healthy men. *Lipids*, 33(2), 125-130. doi:10.1007/s11745-998-0187-9
- Kelton, J. G., & Blajchman, M. A. (1980). Prostaglandin I2 (prostacyclin). *Can Med Assoc J*, 122(2), 175-179.
- Khanna, S., Biswas, S., Shang, Y., Collard, E., Azad, A., Kauh, C., . . . Roy, S. (2010). Macrophage dysfunction impairs resolution of inflammation in the wounds of diabetic mice. *PLoS One*, 5(3), e9539. doi:10.1371/journal.pone.0009539
- Kielkopf, C. S., Low, J. K. K., Mok, Y. F., Bhatia, S., Palasovski, T., Oakley, A. J., . . . Brown, S. H. J. (2018). Identification of a novel tetrameric structure for human apolipoprotein-D. *J Struct Biol*. doi:10.1016/j.jsb.2018.05.012
- Kim, E. H., Na, H. K., Kim, D. H., Park, S. A., Kim, H. N., Song, N. Y., & Surh, Y. J. (2008). 15-Deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2 induces COX-2 expression through Akt-driven AP-1 activation in human breast cancer cells: a potential role of ROS. *Carcinogenesis*, 29(4), 688-695. doi:10.1093/carcin/bgm299
- Kitaura, Y., Inoue, K., Kato, N., Matsushita, N., & Shimomura, Y. (2015). Enhanced oleate uptake and lipotoxicity associated with laurate. *FEBS Open Bio*, 5, 485-491. doi:10.1016/j.fob.2015.05.008
- Kleiner, D. E., Brunt, E. M., Van Natta, M., Behling, C., Contos, M. J., Cummings, O. W., . . . Nonalcoholic Steatohepatitis Clinical Research, N. (2005). Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*, 41(6), 1313-1321. doi:10.1002/hep.20701
- Kleiner, D. E., & Stetler-Stevenson, W. G. (1999). Matrix metalloproteinases and metastasis. *Cancer Chemother Pharmacol*, 43 Suppl, S42-51. doi:10.1007/s002800051097
- Kliwer, S. A., Lenhard, J. M., Willson, T. M., Patel, I., Morris, D. C., & Lehmann, J. M. (1995). A prostaglandin J2 metabolite binds peroxisome proliferator-activated receptor γ and promotes adipocyte differentiation. *Cell*, 83(5), 813-819. doi:10.1016/0092-8674(95)90194-9
- Kliwer, S. A., Sundseth, S. S., Jones, S. A., Brown, P. J., Wisely, G. B., Koble, C. S., . . . Lehmann, J. M. (1997a). Fatty acids and eicosanoids regulate gene expression through direct interactions with peroxisome proliferator-activated receptors α and γ . *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(9), 4318-4325.

- Kliwer, S. A., Sundseth, S. S., Jones, S. A., Brown, P. J., Wisely, G. B., Koble, C. S., . . . Lehmann, J. M. (1997b). Fatty acids and eicosanoids regulate gene expression through direct interactions with peroxisome proliferator-activated receptors α and γ . *PNAS*, *94*(9), 4318-4323.
- Kobzar, G., Mardla, V., Jarving, I., & Samel, N. (2001). Comparison of anti-aggregatory effects of PGI₂, PGI₃ and iloprost on human and rabbit platelets. *Cell Physiol Biochem*, *11*(5), 279-284. doi:10.1159/000047814
- Kohli, R., Kirby, M., Xanthakos, S. A., Softic, S., Feldstein, A. E., Saxena, V., . . . Seeley, R. J. (2010). High-fructose, medium chain trans fat diet induces liver fibrosis and elevates plasma coenzyme Q9 in a novel murine model of obesity and nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*, *52*(3), 934-944. doi:10.1002/hep.23797
- Kolodny, E. H. (2000). Niemann-Pick disease. *Curr Opin Hematol*, *7*(1), 48-52. doi:10.1097/00062752-200001000-00009
- Konradi, C., & Heckers, S. (2003). Molecular aspects of glutamate dysregulation: implications for schizophrenia and its treatment. *Pharmacol Ther*, *97*(2), 153-179. doi:10.1016/s0163-7258(02)00328-5
- Korns, D., Frasch, S. C., Fernandez-Boyanapalli, R., Henson, P. M., & Bratton, D. L. (2011). Modulation of macrophage efferocytosis in inflammation. *Front Immunol*, *2*, 57. doi:10.3389/fimmu.2011.00057
- Kosacka, J., Gericke, M., Nowicki, M., Kacza, J., Borlak, J., & Spanel-Borowski, K. (2009). Apolipoproteins D and E3 exert neurotrophic and synaptogenic effects in dorsal root ganglion cell cultures. *Neuroscience*, *162*(2), 282-291. doi:10.1016/j.neuroscience.2009.04.073
- Kraakman, M. J., Murphy, A. J., Jandeleit-Dahm, K., & Kammoun, H. L. (2014). Macrophage polarization in obesity and type 2 diabetes: weighing down our understanding of macrophage function? *Front Immunol*, *5*, 470. doi:10.3389/fimmu.2014.00470
- Kuehl, F., & Egan, R. (1980). Prostaglandins, arachidonic acid, and inflammation. *Science*, *210*(4473), 978-984. doi:10.1126/science.6254151
- Kuiper, J., Zijlstra, F. J., Kamps, J. A. A. M., & van Berkel, T. J. C. (1988). Identification of prostaglandin D₂ as the major eicosanoid from liver endothelial and Kupffer cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism*, *959*(2), 143-152. doi:10.1016/0005-2760(88)90025-2
- Kuk, J. L., Saunders, T. J., Davidson, L. E., & Ross, R. (2009). Age-related changes in total and regional fat distribution. *Ageing Res Rev*, *8*(4), 339-348. doi:10.1016/j.arr.2009.06.001
- Labrie, M., Lalonde, S., Najyb, O., Thiery, M., Daneault, C., Des Rosiers, C., . . . Mounier, C. (2015). Apolipoprotein D Transgenic Mice Develop Hepatic Steatosis through Activation of PPAR γ and Fatty Acid Uptake. *PLoS One*, *10*(6), e0130230. doi:10.1371/journal.pone.0130230

- Lai, C. J., Cheng, H. C., Lin, C. Y., Huang, S. H., Chen, T. H., Chung, C. J., . . . Chuu, C. P. (2017). Activation of liver X receptor suppresses angiogenesis via induction of ApoD. *FASEB J*, *31*(12), 5568-5576. doi:10.1096/fj.201700374R
- Lambert, J., Provost, P. R., Marcel, Y. L., & Rassart, E. (1993). Structure of the human apolipoprotein D gene promoter region. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression*, *1172*(1-2), 190-192. doi:10.1016/0167-4781(93)90292-1
- Lau, B. Y., Cohen, D. J., Ward, W. E., & Ma, D. W. (2013). Investigating the role of polyunsaturated fatty acids in bone development using animal models. *Molecules*, *18*(11), 14203-14227. doi:10.3390/molecules181114203
- Laugharne, J. D., Mellor, J. E., & Peet, M. (1996). Fatty acids and schizophrenia. *Lipids*, *31 Suppl*, S163-165. doi:10.1007/BF02637070
- Lea, O. A. (1988). Binding properties of Progesterone-Binding Cyst Protein, PBCP. *Steroids*, *52*(4), 337-338. doi:10.1016/0039-128x(88)90135-3
- Lebreton, F., Berishvili, E., Parnaud, G., Rouget, C., Bosco, D., Berney, T., & Lavallard, V. (2018). NLRP3 inflammasome is expressed and regulated in human islets. *Cell Death Dis*, *9*(7), 726. doi:10.1038/s41419-018-0764-x
- Lee, E., Hwang, I., Park, S., Hong, S., Hwang, B., Cho, Y., . . . Yu, J. W. (2019). MPTP-driven NLRP3 inflammasome activation in microglia plays a central role in dopaminergic neurodegeneration. *Cell Death Differ*, *26*(2), 213-228. doi:10.1038/s41418-018-0124-5
- Lee, G. S., Subramanian, N., Kim, A. I., Aksentijevich, I., Goldbach-Mansky, R., Sacks, D. B., . . . Chae, J. J. (2012). The calcium-sensing receptor regulates the NLRP3 inflammasome through Ca²⁺ and cAMP. *Nature*, *492*(7427), 123-127. doi:10.1038/nature11588
- Lee, K., Shao, H., Weissleder, R., & Lee, H. (2015). Acoustic purification of extracellular microvesicles. *ACS Nano*, *9*(3), 2321-2327. doi:10.1021/nn506538f
- Lee, K. Y. (2019). M1 and M2 polarization of macrophages: a mini-review. *Medical Biological Science and Engineering*, *2*(1), 1-5. doi:10.30579/mbse.2019.2.1.1
- Lee, M. J., Wu, Y., & Fried, S. K. (2013). Adipose tissue heterogeneity: implication of depot differences in adipose tissue for obesity complications. *Mol Aspects Med*, *34*(1), 1-11. doi:10.1016/j.mam.2012.10.001
- Lee, S., Nakahira, K., Dalli, J., Siempos, II, Norris, P. C., Colas, R. A., . . . Choi, A. M. K. (2017). NLRP3 Inflammasome Deficiency Protects against Microbial Sepsis via Increased Lipoxin B4 Synthesis. *Am J Respir Crit Care Med*, *196*(6), 713-726. doi:10.1164/rccm.201604-0892OC
- Lepage, G., & Roy, C. C. (1986). Direct transesterification of all classes of lipids in a one-step reaction. *J Lipid Res*, *27*(1), 114-120.
- Letchuman, V., & Donohoe, C. (2020). Neuroanatomy, Superior Sagittal Sinus. In *StatPearls*. Treasure Island (FL).

- Leung, W. C., Lawrie, A., Demaries, S., Massaelli, H., Burry, A., Yablonsky, S., . . . Rabinovitch, M. (2004). Apolipoprotein D and platelet-derived growth factor-BB synergism mediates vascular smooth muscle cell migration. *Circ Res*, *95*(2), 179-186. doi:10.1161/01.RES.0000135482.74178.14
- Levros, L. C., Jr., Do Carmo, S., Edouard, E., Legault, P., Charfi, C., & Rassart, E. (2010). Characterization of nuclear factors modulating the apolipoprotein D promoter during growth arrest: implication of PARP-1, APEX-1 and ERK1/2 catalytic activities. *Biochim Biophys Acta*, *1803*(9), 1062-1071. doi:10.1016/j.bbamcr.2010.04.011
- Levros, L. C., Jr., Labrie, M., Charfi, C., & Rassart, E. (2013). Binding and repressive activities of apolipoprotein E3 and E4 isoforms on the human ApoD promoter. *Mol Neurobiol*, *48*(3), 669-680. doi:10.1007/s12035-013-8456-0
- Levy, B. D., Clish, C. B., Schmidt, B., Gronert, K., & Serhan, C. N. (2001). Lipid mediator class switching during acute inflammation: signals in resolution. *Nat Immunol*, *2*(7), 612-619. doi:10.1038/89759
- Li, G., Simon, M. J., Cancel, L. M., Shi, Z. D., Ji, X., Tarbell, J. M., . . . Fu, B. M. (2010). Permeability of endothelial and astrocyte cocultures: in vitro blood-brain barrier models for drug delivery studies. *Ann Biomed Eng*, *38*(8), 2499-2511. doi:10.1007/s10439-010-0023-5
- Li, H., Ruberu, K., Karl, T., & Garner, B. (2016). Cerebral Apolipoprotein-D Is Hypoglycosylated Compared to Peripheral Tissues and Is Variably Expressed in Mouse and Human Brain Regions. *PLoS One*, *11*(2), e0148238. doi:10.1371/journal.pone.0148238
- Li, K., Wong, D. K., Luk, F. S., Kim, R. Y., & Raffai, R. L. (2018). Isolation of Plasma Lipoproteins as a Source of Extracellular RNA. *Methods Mol Biol*, *1740*, 139-153. doi:10.1007/978-1-4939-7652-2_11
- Li, P., Oh, D. Y., Bandyopadhyay, G., Lagakos, W. S., Talukdar, S., Osborn, O., . . . Olefsky, J. M. (2015). LTB4 promotes insulin resistance in obese mice by acting on macrophages, hepatocytes and myocytes. *Nat Med*, *21*(3), 239-247. doi:10.1038/nm.3800
- Li, Y., Maher, P., & Schubert, D. (1997). A Role for 12-lipoxygenase in Nerve Cell Death Caused by Glutathione Depletion. *Neuron*, *19*(2), 453-463. doi:10.1016/s0896-6273(00)80953-8
- Liang, W., Menke, A. L., Driessen, A., Koek, G. H., Lindeman, J. H., Stoop, R., . . . van den Hoek, A. M. (2014). Establishment of a general NAFLD scoring system for rodent models and comparison to human liver pathology. *PLoS One*, *9*(12), e115922. doi:10.1371/journal.pone.0115922
- Liao, S., & von der Weid, P. Y. (2015). Lymphatic system: an active pathway for immune protection. *Semin Cell Dev Biol*, *38*, 83-89. doi:10.1016/j.semcdb.2014.11.012

- Libby, P. (2017). Interleukin-1 Beta as a Target for Atherosclerosis Therapy: Biological Basis of CANTOS and Beyond. *J Am Coll Cardiol*, 70(18), 2278-2289. doi:10.1016/j.jacc.2017.09.028
- Liu, Z., Chang, G. Q., & Leibowitz, S. F. (2001). Apolipoprotein D interacts with the long-form leptin receptor: a hypothalamic function in the control of energy homeostasis. *FASEB J*, 15(7), 1329-1331. doi:10.1096/fj.00-0530fje
- Lobato, N. S., Filgueira, F. P., Akamine, E. H., Davel, A. P., Rossoni, L. V., Tostes, R. C., . . . Fortes, Z. B. (2011). Obesity induced by neonatal treatment with monosodium glutamate impairs microvascular reactivity in adult rats: role of NO and prostanoids. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 21(10), 808-816. doi:10.1016/j.numecd.2010.02.006
- Lobato, N. S., Filgueira, F. P., Akamine, E. H., Tostes, R. C., Carvalho, M. H., & Fortes, Z. B. (2012). Mechanisms of endothelial dysfunction in obesity-associated hypertension. *Braz J Med Biol Res*, 45(5), 392-400. doi:10.1590/s0100-879x2012007500058
- Lopez-Boado, Y. S., Klaus, M., Dawson, M. I., & Lopez-Otin, C. (1996). Retinoic acid-induced expression of apolipoprotein D and concomitant growth arrest in human breast cancer cells are mediated through a retinoic acid receptor RARalpha-dependent signaling pathway. *J Biol Chem*, 271(50), 32105-32111. doi:10.1074/jbc.271.50.32105
- López-Boado, Y. S., Puente, X. S., Alvarez, S., Tolivia, J., Binderup, L., & López-Otín, C. (1997). Growth inhibition of human breast cancer cells by 1,25-dihydroxyvitamin D3 is accompanied by induction of apolipoprotein D expression. *Cancer Res*, 57(18), 4091-4097.
- López-Boado, Y. S., Tolivia, J., & López-Otín, C. (1994). Apolipoprotein D gene induction by retinoic acid is concomitant with growth arrest and cell differentiation in human breast cancer cells. *J Biol Chem*, 269(43), 26871-26878.
- Lounis, M. A., Escoula, Q., Veillette, C., Bergeron, K. F., Ntambi, J. M., & Mounier, C. (2016). SCD1 deficiency protects mice against ethanol-induced liver injury. *Biochim Biophys Acta*, 1861(11), 1662-1670. doi:10.1016/j.bbalip.2016.07.012
- Lucido, M. J., Orlando, B. J., Vecchio, A. J., & Malkowski, M. G. (2016). Crystal Structure of Aspirin-Acetylated Human Cyclooxygenase-2: Insight into the Formation of Products with Reversed Stereochemistry. *Biochemistry*, 55(8), 1226-1238. doi:10.1021/acs.biochem.5b01378
- Lumeng, C. N., Bodzin, J. L., & Saltiel, A. R. (2007). Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *Journal of Clinical Investigation*, 117(1), 175-184. doi:10.1172/jci29881
- Luo, W., Xu, Q., Wang, Q., Wu, H., & Hua, J. (2017). Effect of modulation of PPAR-gamma activity on Kupffer cells M1/M2 polarization in the development of non-alcoholic fatty liver disease. *Sci Rep*, 7, 44612. doi:10.1038/srep44612

- Ma, K. L., Zhang, Y., Liu, J., Wu, Y., Hu, Z. B., Liu, L., & Liu, B. C. (2015). Inflammatory stress induces lipid accumulation in multi-organs of db/db mice. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, *47*(10), 767-774. doi:10.1093/abbs/gmv079
- Mahadik, S. (2002). Elevated plasma level of apolipoprotein D in schizophrenia and its treatment and outcome. *Schizophrenia Research*, *58*(1), 55-62. doi:10.1016/s0920-9964(01)00378-4
- Majerus, P. W. (1983). Arachidonate metabolism in vascular disorders. *J Clin Invest*, *72*(5), 1521-1525. doi:10.1172/JCI111110
- Makino, S., Zaragoza, D. B., Mitchell, B. F., Robertson, S., & Olson, D. M. (2007). Prostaglandin F₂alpha and its receptor as activators of human decidua. *Semin Reprod Med*, *25*(1), 60-68. doi:10.1055/s-2006-956776
- Man, S. M., Karki, R., & Kanneganti, T. D. (2016). AIM2 inflammasome in infection, cancer, and autoimmunity: Role in DNA sensing, inflammation, and innate immunity. *Eur J Immunol*, *46*(2), 269-280. doi:10.1002/eji.201545839
- Marceau, P., Hould, F. S., Simard, S., Lebel, S., Bourque, R. A., Potvin, M., & Biron, S. (1998). Biliopancreatic diversion with duodenal switch. *World J Surg*, *22*(9), 947-954. doi:10.1007/s002689900498
- Marcoux-Legault, K. (1997). *Mise au point de tests de liaison en conditions physiologiques entre l'apolipoprotéine D et ses différents ligands*. (Maîtrise Recherche), Université du Québec à Montréal, Montréal. (5128)
- Marette, A., Mauriege, P., Marcotte, B., Atgie, C., Bouchard, C., Theriault, G., . . . Despres, J. P. (1997). Regional variation in adipose tissue insulin action and GLUT4 glucose transporter expression in severely obese premenopausal women. *Diabetologia*, *40*(5), 590-598. doi:10.1007/s001250050720
- Margraf-Schonfeld, S., Bohm, C., & Watzl, C. (2011). Glycosylation affects ligand binding and function of the activating natural killer cell receptor 2B4 (CD244) protein. *J Biol Chem*, *286*(27), 24142-24149. doi:10.1074/jbc.M111.225334
- Markovic, T., Jakopin, Z., Dolenc, M. S., & Mlinaric-Rascan, I. (2017). Structural features of subtype-selective EP receptor modulators. *Drug Discov Today*, *22*(1), 57-71. doi:10.1016/j.drudis.2016.08.003
- Martin-Sanz, P., Mayoral, R., Casado, M., & Bosca, L. (2010). COX-2 in liver, from regeneration to hepatocarcinogenesis: what we have learned from animal models? *World J Gastroenterol*, *16*(12), 1430-1435. doi:10.3748/wjg.v16.i12.1430
- Martineau, C., Najyb, O., Signor, C., Rassart, E., & Moreau, R. (2016). Apolipoprotein D deficiency is associated to high bone turnover, low bone mass and impaired osteoblastic function in aged female mice. *Metabolism*, *65*(9), 1247-1258. doi:10.1016/j.metabol.2016.05.007
- Martinez-Fernandez, L., Gonzalez-Muniesa, P., Laiglesia, L. M., Sainz, N., Prieto-Hontoria, P. L., Escote, X., . . . Moreno-Aliaga, M. J. (2017). Maresin 1 improves insulin sensitivity and attenuates adipose tissue inflammation in ob/ob

- and diet-induced obese mice. *FASEB J*, 31(5), 2135-2145. doi:10.1096/fj.201600859R
- Masarone, M., Rosato, V., Dallio, M., Gravina, A. G., Aglitti, A., Loguercio, C., . . . Persico, M. (2018). Role of Oxidative Stress in Pathophysiology of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Oxid Med Cell Longev*, 2018, 9547613. doi:10.1155/2018/9547613
- Matsuyama, M., Yoshimura, R., Mitsuhashi, M., Tsuchida, K., Takemoto, Y., Kawahito, Y., . . . Tatsuya, N. (2005). 5-Lipoxygenase inhibitors attenuate growth of human renal cell carcinoma and induce apoptosis through arachidonic acid pathway. *Oncol Rep*, 14(1), 73-79.
- Matthews, D. R., Hosker, J. P., Rudenski, A. S., Naylor, B. A., Treacher, D. F., & Turner, R. C. (1985). Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia*, 28(7), 412-419. doi:10.1007/bf00280883
- Matyash, V., Liebisch, G., Kurzchalia, T. V., Shevchenko, A., & Schwudke, D. (2008). Lipid extraction by methyl-tert-butyl ether for high-throughput lipidomics. *J Lipid Res*, 49(5), 1137-1146. doi:10.1194/jlr.D700041-JLR200
- Mauriege, P., Joannisse, D. R., Cartier, A., Lemieux, I., Bergeron, J., Biron, S., . . . Richard, D. (2016). Gene expression in a rarely studied intraabdominal adipose depot, the round ligament, in severely obese women: A pilot study. *Adipocyte*, 5(1), 27-34. doi:10.1080/21623945.2015.1103404
- Mauriege, P., Joannisse, D. R., CasparBauguil, S., Cartier, A., Lemieux, I., Bergeron, J., . . . Richard, D. (2015). Gene expression of different adipose tissues of severely obese women with or without a dysmetabolic profile. *J Physiol Biochem*, 71(4), 719-732. doi:10.1007/s13105-015-0436-6
- Mauriege, P., Marette, A., Atgie, C., Bouchard, C., Theriault, G., Bukowiecki, L. K., . . . Despres, J. P. (1995). Regional variation in adipose tissue metabolism of severely obese premenopausal women. *J Lipid Res*, 36(4), 672-684.
- Mazid, M. A., Chowdhury, A. A., Nagao, K., Nishimura, K., Jisaka, M., Nagaya, T., & Yokota, K. (2006). Endogenous 15-deoxy-Delta(12,14)-prostaglandin J(2) synthesized by adipocytes during maturation phase contributes to upregulation of fat storage. *FEBS Lett*, 580(30), 6885-6890. doi:10.1016/j.febslet.2006.11.049
- Mbarik, M., Biam, R. S., Robichaud, P. P., & Surette, M. E. (2020). The impact of PUFA on cell responses: Caution should be exercised when selecting PUFA concentrations in cell culture. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 155, 102083. doi:10.1016/j.plefa.2020.102083
- McConathy, W. J., & Alaupovic, P. (1976). Studies on the isolation and partial characterization of apolipoprotein D and lipoprotein D of human plasma. *Biochemistry*, 15(3), 515-520. doi:10.1021/bi00648a010
- McFarlane, A. (1958). Efficient trace-labelling of proteins with iodine. *Nature*, 182(4627), 53. doi:10.1038/182053a0

- McIntyre, C., Saville, J., & Fuller, M. (2019). Collection of cerebrospinal fluid from murine lateral ventricles for biomarker determination in mucopolysaccharidosis type IIIA. *J Neurosci Methods*, *324*, 108314. doi:10.1016/j.jneumeth.2019.108314
- Medeiros, R., Figueiredo, C. P., Pandolfo, P., Duarte, F. S., Prediger, R. D., Passos, G. F., & Calixto, J. B. (2010). The role of TNF-alpha signaling pathway on COX-2 upregulation and cognitive decline induced by beta-amyloid peptide. *Behav Brain Res*, *209*(1), 165-173. doi:10.1016/j.bbr.2010.01.040
- Meyer, J., Gonelle-Gispert, C., Morel, P., & Buhler, L. (2016). Methods for Isolation and Purification of Murine Liver Sinusoidal Endothelial Cells: A Systematic Review. *PLoS One*, *11*(3), e0151945. doi:10.1371/journal.pone.0151945
- Miller, C. W., Casimir, D. A., & Ntambi, J. M. (1996). The mechanism of inhibition of 3T3-L1 preadipocyte differentiation by prostaglandin F2alpha. *Endocrinology*, *137*(12), 5641-5650. doi:10.1210/endo.137.12.8940395
- Miller, S. B. (2006). Prostaglandins in health and disease: an overview. *Semin Arthritis Rheum*, *36*(1), 37-49. doi:10.1016/j.semarthrit.2006.03.005
- Milne, G. L., Yin, H., Hardy, K. D., Davies, S. S., & Roberts, L. J., 2nd. (2011). Isoprostane generation and function. *Chem Rev*, *111*(10), 5973-5996. doi:10.1021/cr200160h
- Mine, T., Kojima, I., & Ogata, E. (1990). Mechanism of prostaglandin E2-induced glucose production in rat hepatocytes. *Endocrinology*, *126*(6), 2831-2836. doi:10.1210/endo-126-6-2831
- Miranda, E., Vizoso, F., Martin, A., Quintela, I., Corte, M. D., Segui, M. E., . . . Merino, A. M. (2003). Apolipoprotein D expression in cutaneous malignant melanoma. *J Surg Oncol*, *83*(2), 99-105. doi:10.1002/jso.10245
- Mirza, R. E., Fang, M. M., Weinheimer-Haus, E. M., Ennis, W. J., & Koh, T. J. (2014). Sustained inflammasome activity in macrophages impairs wound healing in type 2 diabetic humans and mice. *Diabetes*, *63*(3), 1103-1114. doi:10.2337/db13-0927
- Miyagi, M., Miwa, Y., Takahashi-Yanaga, F., Morimoto, S., & Sasaguri, T. (2005). Activator protein-1 mediates shear stress-induced prostaglandin d synthase gene expression in vascular endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, *25*(5), 970-975. doi:10.1161/01.ATV.0000159702.68591.0d
- Miyazaki, M., Sampath, H., Liu, X., Flowers, M. T., Chu, K., Dobrzyn, A., & Ntambi, J. M. (2009). Stearoyl-CoA desaturase-1 deficiency attenuates obesity and insulin resistance in leptin-resistant obese mice. *Biochem Biophys Res Commun*, *380*(4), 818-822. doi:10.1016/j.bbrc.2009.01.183
- Mohite, A., Chillar, A., So, S. P., Cervantes, V., & Ruan, K. H. (2011). Novel mechanism of the vascular protector prostacyclin: regulating microRNA expression. *Biochemistry*, *50*(10), 1691-1699. doi:10.1021/bi101654w

- Moieni, M., & Eisenberger, N. I. (2018). Effects of inflammation on social processes and implications for health. *Ann N Y Acad Sci*, *1428*(1), 5-13. doi:10.1111/nyas.13864
- Moncada, S., Herman, A. G., Higgs, E. A., & Vane, J. R. (1977). Differential formation of prostacyclin (PGX or PGI₂) by layers of the arterial wall. An explanation for the anti-thrombotic properties of vascular endothelium. *Thrombosis Research*, *11*(3), 323-344. doi:10.1016/0049-3848(77)90185-2
- Montine, T. J., Montine, K. S., McMahan, W., Markesbery, W. R., Quinn, J. F., & Morrow, J. D. (2005). F₂-isoprostanes in Alzheimer and other neurodegenerative diseases. *Antioxid Redox Signal*, *7*(1-2), 269-275. doi:10.1089/ars.2005.7.269
- Montpied, P., de Bock, F., Lerner-Natoli, M., Bockaert, J., & Rondouin, G. (1999). Hippocampal alterations of apolipoprotein E and D mRNA levels in vivo and in vitro following kainate excitotoxicity. *Epilepsy Research*, *35*(2), 135-146. doi:10.1016/s0920-1211(99)00003-0
- Moon, Y. A., Hammer, R. E., & Horton, J. D. (2009). Deletion of ELOVL5 leads to fatty liver through activation of SREBP-1c in mice. *J Lipid Res*, *50*(3), 412-423. doi:10.1194/jlr.M800383-JLR200
- Moon, Y. A., Liang, G., Xie, X., Frank-Kamenetsky, M., Fitzgerald, K., Koteliansky, V., . . . Horton, J. D. (2012). The Scap/SREBP pathway is essential for developing diabetic fatty liver and carbohydrate-induced hypertriglyceridemia in animals. *Cell Metab*, *15*(2), 240-246. doi:10.1016/j.cmet.2011.12.017
- Moore, J., Cook, J., Morris, D., Halushka, P., & Wise, W. (1990). Endotoxin-induced procoagulant activity, eicosanoid synthesis, and tumor necrosis factor production by rat peritoneal macrophages: effect of endotoxin tolerance and glucan. *Circ Shock*, *31*(3), 281-295.
- Moore, M. L., & Peebles, R. S., Jr. (2006). Update on the role of prostaglandins in allergic lung inflammation: separating friends from foes, harder than you might think. *J Allergy Clin Immunol*, *117*(5), 1036-1039. doi:10.1016/j.jaci.2005.12.1314
- Morais Cabral, J. H., Atkins, G. L., Sánchez, L. M., López-Boado, Y. S., López-Otin, C., & Sawyer, L. (1995). Arachidonic acid binds to apolipoprotein D: implications for the protein's function. *FEBS Letters*, *366*(1), 53-56. doi:10.1016/0014-5793(95)00484-q
- Moran, D. M., Mattocks, M. A., Cahill, P. A., Koniaris, L. G., & McKillop, I. H. (2008). Interleukin-6 mediates G(0)/G(1) growth arrest in hepatocellular carcinoma through a STAT 3-dependent pathway. *J Surg Res*, *147*(1), 23-33. doi:10.1016/j.jss.2007.04.022
- Morgan, M. J., & Liu, Z. G. (2011). Crosstalk of reactive oxygen species and NF-kappaB signaling. *Cell Res*, *21*(1), 103-115. doi:10.1038/cr.2010.178

- Morse, L., Chen, D., Franklin, D., Xiong, Y., & Chen-Kiang, S. (1997). Induction of Cell Cycle Arrest and B Cell Terminal Differentiation by CDK Inhibitor p18 INK4c and IL-6. *Immunity*, 6(1), 47-56. doi:10.1016/s1074-7613(00)80241-1
- Mridha, A. R., Wree, A., Robertson, A. A. B., Yeh, M. M., Johnson, C. D., Van Rooyen, D. M., . . . Farrell, G. C. (2017). NLRP3 inflammasome blockade reduces liver inflammation and fibrosis in experimental NASH in mice. *J Hepatol*, 66(5), 1037-1046. doi:10.1016/j.jhep.2017.01.022
- Muffat, J., & Walker, D. W. (2010). Apolipoprotein D: an overview of its role in aging and age-related diseases. *Cell Cycle*, 9(2), 269-273. doi:10.4161/cc.9.2.10433
- Muffat, J., Walker, D. W., & Benzer, S. (2008). Human ApoD, an apolipoprotein up-regulated in neurodegenerative diseases, extends lifespan and increases stress resistance in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(19), 7088-7093. doi:10.1073/pnas.0800896105
- Mullard, A. (2019). NLRP3 inhibitors stoke anti-inflammatory ambitions. *Nat Rev Drug Discov*, 18(6), 405-407. doi:10.1038/d41573-019-00086-9
- Murphy, R. C., & Gijon, M. A. (2007). Biosynthesis and metabolism of leukotrienes. *Biochem J*, 405(3), 379-395. doi:10.1042/BJ20070289
- Mutch, D. G., Powell, C. B., Kao, M.-S., & Collins, J. L. (1992). Resistance to cytolysis by tumor necrosis factor alpha in malignant gynecological cell lines is associated with the expression of protein(s) that prevent the activation of phospholipase A2 by tumor necrosis factor alpha. *Cancer Research*, 52, 866-872.
- Najyb, O., Brissette, L., & Rassart, E. (2015). Apolipoprotein D Internalization Is a Basigin-dependent Mechanism. *J Biol Chem*, 290(26), 16077-16087. doi:10.1074/jbc.M115.644302
- Najyb, O., Do Carmo, S., Alikashani, A., & Rassart, E. (2017). Apolipoprotein D Overexpression Protects Against Kainate-Induced Neurotoxicity in Mice. *Mol Neurobiol*, 54(6), 3948-3963. doi:10.1007/s12035-016-9920-4
- Nakahata, N. (2008). Thromboxane A2: physiology/pathophysiology, cellular signal transduction and pharmacology. *Pharmacol Ther*, 118(1), 18-35. doi:10.1016/j.pharmthera.2008.01.001
- Nakanishi, M., & Rosenberg, D. W. (2013). Multifaceted roles of PGE2 in inflammation and cancer. *Semin Immunopathol*, 35(2), 123-137. doi:10.1007/s00281-012-0342-8
- Nasrallah, R., Hassouneh, R., & Hebert, R. L. (2016). PGE2, Kidney Disease, and Cardiovascular Risk: Beyond Hypertension and Diabetes. *J Am Soc Nephrol*, 27(3), 666-676. doi:10.1681/ASN.2015050528
- Navarro, A., del Valle, E., Astudillo, A., González del Rey, C., & Tolivia, J. (2003). Immunohistochemical study of distribution of apolipoproteins E and D in human cerebral β amyloid deposits. *Experimental Neurology*, 184(2), 697-704. doi:10.1016/s0014-4886(03)00315-7

- Navarro, A., Del Valle, E., & Tolivia, J. (2004). Differential expression of apolipoprotein d in human astroglial and oligodendroglial cells. *J Histochem Cytochem*, 52(8), 1031-1036. doi:10.1369/jhc.3A6213.2004
- Navarro, A., Tolivia, J., Astudillo, A., & del Valle, E. (1998). Pattern of apolipoprotein D immunoreactivity in human brain. *Neuroscience Letters*, 254(1), 17-20. doi:10.1016/s0304-3940(98)00639-9
- Netter, F. H. (1989). Mesenteric relations of intestines-Omental bursa: cross section-Stomach in situ-Visceral vasculature. In *Atlas of human anatomy* (pp. 254): Atlas of human anatomy.
- Neuhofer, A., Zeyda, M., Mascher, D., Itariu, B. K., Murano, I., Leitner, L., . . . Stulnig, T. M. (2013). Impaired local production of proresolving lipid mediators in obesity and 17-HDHA as a potential treatment for obesity-associated inflammation. *Diabetes*, 62(6), 1945-1956. doi:10.2337/db12-0828
- Ng, M., Fleming, T., Robinson, M., Thomson, B., Graetz, N., Margono, C., . . . Gakidou, E. (2014). Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *The Lancet*, 384(9945), 766-781. doi:10.1016/s0140-6736(14)60460-8
- Nguyen, V. S., Loh, X. Y., Wijaya, H., Wang, J., Lin, Q., Lam, Y., . . . Mok, Y. K. (2015). Specificity and inhibitory mechanism of andrographolide and its analogues as antiasthma agents on NF-kappaB p50. *J Nat Prod*, 78(2), 208-217. doi:10.1021/np5007179
- Nieto-Vazquez, I., Fernandez-Veledo, S., Kramer, D. K., Vila-Bedmar, R., Garcia-Guerra, L., & Lorenzo, M. (2008). Insulin resistance associated to obesity: the link TNF-alpha. *Arch Physiol Biochem*, 114(3), 183-194. doi:10.1080/13813450802181047
- Nomiyama, T., Perez-Tilve, D., Ogawa, D., Gizard, F., Zhao, Y., Heywood, E. B., . . . Bruemmer, D. (2007). Osteopontin mediates obesity-induced adipose tissue macrophage infiltration and insulin resistance in mice. *J Clin Invest*, 117(10), 2877-2888. doi:10.1172/JCI31986
- Novak, M. L., & Koh, T. J. (2013). Macrophage phenotypes during tissue repair. *J Leukoc Biol*, 93(6), 875-881. doi:10.1189/jlb.1012512
- Nowell, S. A., Leakey, J. E., Warren, J. F., Lang, N. P., & Frame, L. T. (1998). Identification of enzymes responsible for the metabolism of heme in human platelets. *J Biol Chem*, 273(50), 33342-33346. doi:10.1074/jbc.273.50.33342
- Nugent, C., Prins, J. B., Whitehead, J. P., Wentworth, J. M., Chatterjee, V. K., & O'Rahilly, S. (2001). Arachidonic acid stimulates glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes by increasing GLUT1 and GLUT4 levels at the plasma membrane. Evidence for involvement of lipoxygenase metabolites and peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *J Biol Chem*, 276(12), 9149-9157. doi:10.1074/jbc.M009817200

- Oakley, A. J., Bhatia, S., Ecroyd, H., & Garner, B. (2012). Molecular dynamics analysis of apolipoprotein-D-lipid hydroperoxide interactions: mechanism for selective oxidation of Met-93. *PLoS One*, 7(3), e34057. doi:10.1371/journal.pone.0034057
- Ogasawara, Y., Itakura, E., Kono, N., Mizushima, N., Arai, H., Nara, A., . . . Yamamoto, A. (2014). Stearoyl-CoA desaturase 1 activity is required for autophagosome formation. *J Biol Chem*, 289(34), 23938-23950. doi:10.1074/jbc.M114.591065
- Ohmura, T., Tian, Y., Sarich, N., Ke, Y., Meliton, A., Shah, A. S., . . . Birukova, A. A. (2017). Regulation of lung endothelial permeability and inflammatory responses by prostaglandin A2: role of EP4 receptor. *Mol Biol Cell*, 28(12), 1622-1635. doi:10.1091/mbc.E16-09-0639
- Ong, W. Y., He, Y., Suresh, S., & Patel, S. C. (1997). Differential expression of apolipoprotein D and apolipoprotein E in the kainic acid-lesioned rat hippocampus. *Neuroscience*, 79(2), 359-367. doi:10.1016/s0306-4522(96)00608-2
- Ong, W. Y., Hu, C. Y., & Patel, S. C. (2002). Apolipoprotein D in the Niemann-Pick type C disease mouse brain: an ultrastructural immunocytochemical analysis. *J Neurocytol*, 31(2), 121-129. doi:10.1023/a:1023993405851
- Oram, J. F., & Heinecke, J. W. (2007). Role of amphipathic α -helical structural elements in removing cellular cholesterol and protecting against cardiovascular disease. *Future Lipidology*, 2(2), 185-196. doi:10.2217/17460875.2.2.185
- Ordóñez, C., Navarro, A., Perez, C., Astudillo, A., Martínez, E., & Tolivia, J. (2006). Apolipoprotein D expression in substantia nigra of Parkinson disease. *Histol Histopathol*, 21(4), 361-366. doi:10.14670/HH-21.361
- Ouchi, N., Parker, J. L., Lugus, J. J., & Walsh, K. (2011). Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nat Rev Immunol*, 11(2), 85-97. doi:10.1038/nri2921
- Ouellet, V., Labbe, S. M., Blondin, D. P., Phoenix, S., Guerin, B., Haman, F., . . . Carpentier, A. C. (2012). Brown adipose tissue oxidative metabolism contributes to energy expenditure during acute cold exposure in humans. *J Clin Invest*, 122(2), 545-552. doi:10.1172/JCI60433
- Pajaniappan, M., Guber, N. K., Kennard, S., Liu, H., Zhao, N., & Lilly, B. (2011). Endothelial cells downregulate apolipoprotein D expression in mural cells through paracrine secretion and Notch signaling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 301(3), H784-793. doi:10.1152/ajpheart.00116.2011
- Pardridge, W. M. (2016). CSF, blood-brain barrier, and brain drug delivery. *Expert Opin Drug Deliv*, 13(7), 963-975. doi:10.1517/17425247.2016.1171315
- Parmar, K. M., Larman, H. B., Dai, G., Zhang, Y., Wang, E. T., Moorthy, S. N., . . . Garcia-Cardena, G. (2006). Integration of flow-dependent endothelial phenotypes by Kruppel-like factor 2. *J Clin Invest*, 116(1), 49-58. doi:10.1172/JCI24787
- Parmar, K. M., Nambudiri, V., Dai, G., Larman, H. B., Gimbrone, M. A., Jr., & Garcia-Cardena, G. (2005). Statins exert endothelial atheroprotective effects via the

- KLF2 transcription factor. *J Biol Chem*, 280(29), 26714-26719. doi:10.1074/jbc.C500144200
- Pascua-Maestro, R., Gonzalez, E., Lillo, C., Ganfornina, M. D., Falcon-Perez, J. M., & Sanchez, D. (2018). Extracellular Vesicles Secreted by Astroglial Cells Transport Apolipoprotein D to Neurons and Mediate Neuronal Survival Upon Oxidative Stress. *Front Cell Neurosci*, 12, 526. doi:10.3389/fncel.2018.00526
- Patel, R. C., Lange, D., McConathy, W. J., Patel, Y. C., & Patel, S. C. (1997). Probing the structure of the ligand binding cavity of lipocalins by fluorescence spectroscopy. *Protein Eng*, 10(6), 621-625. doi:10.1093/protein/10.6.621
- Pearlman, W. H., Guériguian, J. L., & Sawyer, M. E. (1973). A specific progesterone-binding component of human breast cyst fluid. *J Biol Chem*, 248(16), 5736-5741.
- Peitsch, M., & Boguski, M. (1990). Is apolipoprotein D a mammalian bilin-binding protein? *New Biol.*, 2(2), 197-206.
- Pellicoro, A., Ramachandran, P., Iredale, J. P., & Fallowfield, J. A. (2014). Liver fibrosis and repair: immune regulation of wound healing in a solid organ. *Nat Rev Immunol*, 14(3), 181-194. doi:10.1038/nri3623
- Pepino, M. Y., Kuda, O., Samovski, D., & Abumrad, N. A. (2014). Structure-function of CD36 and importance of fatty acid signal transduction in fat metabolism. *Annu Rev Nutr*, 34, 281-303. doi:10.1146/annurev-nutr-071812-161220
- Perdomo, G., & Henry Dong, H. (2009). Apolipoprotein D in lipid metabolism and its functional implication in atherosclerosis and aging. *Aging (Albany NY)*, 1(1), 17-27. doi:10.18632/aging.100004
- Perdomo, G., Kim, D. H., Zhang, T., Qu, S., Thomas, E. A., Toledo, F. G., . . . Dong, H. H. (2010). A role of apolipoprotein D in triglyceride metabolism. *J Lipid Res*, 51(6), 1298-1311. doi:10.1194/jlr.M001206
- Perrotte, M., Le Page, A., Fournet, M., Le Sayec, M., Rassart, E., Fulop, T., & Ramassamy, C. (2019). Blood-based redox-signature and their association to the cognitive scores in MCI and Alzheimer's disease patients. *Free Radic Biol Med*, 130, 499-511. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2018.10.452
- Pfriege, F. W. (2003). Cholesterol homeostasis and function in neurons of the central nervous system. *Cell Mol Life Sci*, 60(6), 1158-1171. doi:10.1007/s00018-003-3018-7
- Pidgeon, G. P., Kandouz, M., Meram, A., & Honn, K. V. (2002). Mechanisms controlling cell cycle arrest and induction of apoptosis after 12-lipoxygenase inhibition in prostate cancer cells. *Cancer Res*, 62(9), 2721-2727.
- Pierce, G. F. (2001). Inflammation in Nonhealing Diabetic Wounds. *The American Journal of Pathology*, 159(2), 399-403. doi:10.1016/s0002-9440(10)61709-9
- Pilitsis, J. G., Coplin, W. M., O'Regan, M. H., Wellwood, J. M., Diaz, F. G., Fairfax, M. R., . . . Phillis, J. W. (2003). Free fatty acids in cerebrospinal fluids from patients with traumatic brain injury. *Neuroscience Letters*, 349(2), 136-138. doi:10.1016/s0304-3940(03)00803-6

- Pompeia, C., Lima, T., & Curi, R. (2003). Arachidonic acid cytotoxicity: can arachidonic acid be a physiological mediator of cell death? *Cell Biochem Funct*, *21*(2), 97-104. doi:10.1002/cbf.1012
- Porrero, C., Rubio-Garrido, P., Avendano, C., & Clasca, F. (2010). Mapping of fluorescent protein-expressing neurons and axon pathways in adult and developing Thy1-eYFP-H transgenic mice. *Brain Res*, *1345*, 59-72. doi:10.1016/j.brainres.2010.05.061
- Porter, D., Lahti-Domenici, J., Keshaviah, A., Bae, Y. K., Argani, P., Marks, J., . . . Polyak, K. (2003). Molecular markers in ductal carcinoma in situ of the breast. *Mol Cancer Res*, *1*(5), 362-375.
- Provost, P. R., Marcel, Y. L., Milne, R. W., Weech, P. K., & Rassart, E. (1991). Apolipoprotein D transcription occurs specifically in nonproliferating quiescent and senescent fibroblast cultures. *FEBS Letters*, *290*(1-2), 139-141. doi:10.1016/0014-5793(91)81244-3
- Provost, P. R., Tremblay, Y., El-Amine, M., & Bélanger, A. (1995). Guinea pig apolipoprotein D RNA diversity, and developmental and gestational modulation of mRNA levels. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *109*(2), 225-236. doi:10.1016/0303-7207(95)03506-3
- Provost, P. R., Villeneuve, L., Weech, P. K., Milne, R. W., Marcel, Y. L., & Rassart, E. (1991). Localization of the major sites of rabbit apolipoprotein D gene transcription by in situ hybridization. *J Lipid Res*, *32*(12), 1959-1970.
- Provost, P. R., Weech, P. K., Tremblay, N. M., Marcel, Y. L., & Rassart, E. (1990). Molecular characterization and differential mRNA tissue distribution of rabbit apolipoprotein D. *J Lipid Res*, *31*(11), 2057-2065.
- Puri, P., Baillie, R. A., Wiest, M. M., Mirshahi, F., Choudhury, J., Cheung, O., . . . Sanyal, A. J. (2007). A lipidomic analysis of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*, *46*(4), 1081-1090. doi:10.1002/hep.21763
- Puri, P., & Sanyal, A. J. (2012). Nonalcoholic fatty liver disease: Definitions, risk factors, and workup. *Clinical Liver Disease*, *1*(4), 99-103. doi:10.1002/cld.81
- Rabanel, J. M., Piec, P. A., Landri, S., Patten, S. A., & Ramassamy, C. (2020). Transport of PEGylated-PLA nanoparticles across a blood brain barrier model, entry into neuronal cells and in vivo brain bioavailability. *J Control Release*, *328*, 679-695. doi:10.1016/j.jconrel.2020.09.042
- Radhakrishnan, S., Ke, J. Y., & Pellizzon, M. A. (2020). Targeted Nutrient Modifications in Purified Diets Differentially Affect Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Metabolic Disease Development in Rodent Models. *Curr Dev Nutr*, *4*(6), nzaa078. doi:10.1093/cdn/nzaa078
- Ragolia, L., Palaia, T., Hall, C. E., Maesaka, J. K., Eguchi, N., & Urade, Y. (2005). Accelerated glucose intolerance, nephropathy, and atherosclerosis in prostaglandin D2 synthase knock-out mice. *J Biol Chem*, *280*(33), 29946-29955. doi:10.1074/jbc.M502927200

- Rahman, N. A., Rasil, A., Meyding-Lamade, U., Craemer, E. M., Diah, S., Tuah, A. A., & Muharram, S. H. (2016). Immortalized endothelial cell lines for in vitro blood-brain barrier models: A systematic review. *Brain Res*, *1642*, 532-545. doi:10.1016/j.brainres.2016.04.024
- Rajakariar, R., Hilliard, M., Lawrence, T., Trivedi, S., Colville-Nash, P., Bellingan, G., . . . Gilroy, D. W. (2007). Hematopoietic prostaglandin D2 synthase controls the onset and resolution of acute inflammation through PGD2 and 15-deoxyDelta12 14 PGJ2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *104*(52), 20979-20984. doi:10.1073/pnas.0707394104
- Rajamaki, K., Lappalainen, J., Oorni, K., Valimaki, E., Matikainen, S., Kovanen, P. T., & Eklund, K. K. (2010). Cholesterol crystals activate the NLRP3 inflammasome in human macrophages: a novel link between cholesterol metabolism and inflammation. *PLoS One*, *5*(7), e11765. doi:10.1371/journal.pone.0011765
- Ramasamy, I. (2014). Recent advances in physiological lipoprotein metabolism. *Clin Chem Lab Med*, *52*(12), 1695-1727. doi:10.1515/cclm-2013-0358
- Rassart, E., Bedirian, A., Do Carmo, S., Guinard, O., Sirois, J., Terrisse, L., & Milne, R. (2000). Apolipoprotein D. *Biochim Biophys Acta*, *1482*(1-2), 185-198. doi:10.1016/s0167-4838(00)00162-x
- Rassart, E., Desmarais, F., Najyb, O., Bergeron, K. F., & Mounier, C. (2020). Apolipoprotein D. *Gene*, *756*, 144874. doi:10.1016/j.gene.2020.144874
- Razani, B., Feng, C., Coleman, T., Emanuel, R., Wen, H., Hwang, S., . . . Semenkovich, C. F. (2012). Autophagy links inflammasomes to atherosclerotic progression. *Cell Metab*, *15*(4), 534-544. doi:10.1016/j.cmet.2012.02.011
- Recchiuti, A., Krishnamoorthy, S., Fredman, G., Chiang, N., & Serhan, C. N. (2011). MicroRNAs in resolution of acute inflammation: identification of novel resolvin D1-miRNA circuits. *FASEB J*, *25*(2), 544-560. doi:10.1096/fj.10-169599
- Redzic, Z. (2011). Molecular biology of the blood-brain and the blood-cerebrospinal fluid barriers: similarities and differences. *Fluids Barriers CNS*, *8*(1), 3. doi:10.1186/2045-8118-8-3
- Reich, E. E., Markesbery, W. R., Roberts, L. J., Swift, L. L., Morrow, J. D., & Montine, T. J. (2001). Brain Regional Quantification of F-Ring and D-/E-Ring Isoprostanes and Neuroprostanes in Alzheimer's Disease. *The American Journal of Pathology*, *158*(1), 293-297. doi:10.1016/s0002-9440(10)63968-5
- Reindl, M., Knipping, G., Wicher, I., Dilitz, E., Egg, R., Deisenhammer, F., & Berger, T. (2001). Increased intrathecal production of apolipoprotein D in multiple sclerosis. *Journal of Neuroimmunology*, *119*(2), 327-332. doi:10.1016/s0165-5728(01)00378-2
- Remels, A. H., Langen, R. C., Gosker, H. R., Russell, A. P., Spaapen, F., Voncken, J. W., . . . Schols, A. M. (2009). PPARgamma inhibits NF-kappaB-dependent

- transcriptional activation in skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 297(1), E174-183. doi:10.1152/ajpendo.90632.2008
- Rheinheimer, J., de Souza, B. M., Cardoso, N. S., Bauer, A. C., & Crispim, D. (2017). Current role of the NLRP3 inflammasome on obesity and insulin resistance: A systematic review. *Metabolism*, 74, 1-9. doi:10.1016/j.metabol.2017.06.002
- Rhinn, M., & Dolle, P. (2012). Retinoic acid signalling during development. *Development*, 139(5), 843-858. doi:10.1242/dev.065938
- Ricciotti, E., & FitzGerald, G. A. (2011). Prostaglandins and inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 31(5), 986-1000. doi:10.1161/ATVBAHA.110.207449
- Rickhag, M., Deierborg, T., Patel, S., Ruscher, K., & Wieloch, T. (2008). Apolipoprotein D is elevated in oligodendrocytes in the peri-infarct region after experimental stroke: influence of enriched environment. *J Cereb Blood Flow Metab*, 28(3), 551-562. doi:10.1038/sj.jcbfm.9600552
- Rickhag, M., Wieloch, T., Gido, G., Elmer, E., Krogh, M., Murray, J., . . . Nikolich, K. (2006). Comprehensive regional and temporal gene expression profiling of the rat brain during the first 24 h after experimental stroke identifies dynamic ischemia-induced gene expression patterns, and reveals a biphasic activation of genes in surviving tissue. *J Neurochem*, 96(1), 14-29. doi:10.1111/j.1471-4159.2005.03508.x
- Rinella, M. E. (2015). Nonalcoholic fatty liver disease: a systematic review. *JAMA*, 313(22), 2263-2273. doi:10.1001/jama.2015.5370
- Rittling, S. R., Matsumoto, H. N., McKee, M. D., Nanci, A., An, X. R., Novick, K. E., . . . Denhardt, D. T. (1998). Mice lacking osteopontin show normal development and bone structure but display altered osteoclast formation in vitro. *J Bone Miner Res*, 13(7), 1101-1111. doi:10.1359/jbmr.1998.13.7.1101
- Rodewald, R., & Karnovsky, M. J. (1974). Porous substructure of the glomerular slit diaphragm in the rat and mouse. *J Cell Biol*, 60(2), 423-433. doi:10.1083/jcb.60.2.423
- Roman, B. L., & Pekkan, K. (2012). Mechanotransduction in embryonic vascular development. *Biomech Model Mechanobiol*, 11(8), 1149-1168. doi:10.1007/s10237-012-0412-9
- Romano, M., & Claria, J. (2003). Cyclooxygenase-2 and 5-lipoxygenase converging functions on cell proliferation and tumor angiogenesis: implications for cancer therapy. *FASEB J*, 17(14), 1986-1995. doi:10.1096/fj.03-0053rev
- Rossi, A., Kapahi, P., Natoli, G., Takahashi, T., Chen, Y., Karin, M., & Santoro, M. G. (2000). Anti-inflammatory cyclopentenone prostaglandins are direct inhibitors of IkappaB kinase. *Nature*, 403(6765), 103-108. doi:10.1038/47520
- Roszer, T. (2015). Understanding the Mysterious M2 Macrophage through Activation Markers and Effector Mechanisms. *Mediators Inflamm*, 2015, 816460. doi:10.1155/2015/816460

- Rudland, P. S., Platt-Higgins, A., El-Tanani, M., De Silva Rudland, S., Barraclough, R., Winstanley, J. H., . . . West, C. R. (2002). Prognostic significance of the metastasis-associated protein osteopontin in human breast cancer. *Cancer Res*, *62*(12), 3417-3427.
- Ruggiero, A., Villa, C. H., Bander, E., Rey, D. A., Bergkvist, M., Batt, C. A., . . . McDevitt, M. R. (2010). Paradoxical glomerular filtration of carbon nanotubes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *107*(27), 12369-12374. doi:10.1073/pnas.0913667107
- Ruiz, M., Sanchez, D., Correnti, C., Strong, R. K., & Ganfornina, M. D. (2013). Lipid-binding properties of human ApoD and Lazarillo-related lipocalins: functional implications for cell differentiation. *FEBS J*, *280*(16), 3928-3943. doi:10.1111/febs.12394
- Ruiz, M., Wicker-Thomas, C., Sanchez, D., & Ganfornina, M. D. (2012). Grasshopper Lazarillo, a GPI-anchored Lipocalin, increases *Drosophila* longevity and stress resistance, and functionally replaces its secreted homolog NLaz. *Insect Biochem Mol Biol*, *42*(10), 776-789. doi:10.1016/j.ibmb.2012.07.005
- Ryu, B., Jones, J., Hollingsworth, M. A., Hruban, R. H., & Kern, S. E. (2001). Invasion-specific genes in malignancy: serial analysis of gene expression comparisons of primary and passaged cancers. *Cancer Res*, *61*(5), 1833-1838.
- Salami, M., Bandegi, A. R., Sameni, H. R., Vafaei, A. A., & Pakdel, A. (2019). Hippocampal Up-Regulation of Apolipoprotein D in a Rat Model of Maternal Hypo- and Hyperthyroidism: Implication of Oxidative Stress. *Neurochem Res*, *44*(9), 2190-2201. doi:10.1007/s11064-019-02859-5
- Saltiel, A. R., & Olefsky, J. M. (2017). Inflammatory mechanisms linking obesity and metabolic disease. *J Clin Invest*, *127*(1), 1-4. doi:10.1172/JCI92035
- Sánchez, D., Ganfornina, M. a. D., & Martínez, S. (2002). Expression pattern of the lipocalin Apolipoprotein D during mouse embryogenesis. *Mechanisms of Development*, *110*(1-2), 225-229. doi:10.1016/s0925-4773(01)00578-0
- Sanchez, D., Ganfornina, M. D., Gutierrez, G., & Marin, A. (2003). Exon-intron structure and evolution of the Lipocalin gene family. *Mol Biol Evol*, *20*(5), 775-783. doi:10.1093/molbev/msg079
- Sanchez, D., Ganfornina, M. D., Torres-Schumann, S., Speese, S. D., Lora, J. M., & Bastiani, M. J. (2000). Characterization of two novel lipocalins expressed in the *Drosophila* embryonic nervous system. *Int J Dev Biol*, *44*(4), 349-359.
- Sanchez, D., Lopez-Arias, B., Torroja, L., Canal, I., Wang, X., Bastiani, M. J., & Ganfornina, M. D. (2006). Loss of glial lazarus, a homolog of apolipoprotein D, reduces lifespan and stress resistance in *Drosophila*. *Curr Biol*, *16*(7), 680-686. doi:10.1016/j.cub.2006.03.024
- Sanchez, D., Ortega-Cubero, S., Akerstrom, B., Herrera, M., Bastiani, M. J., & Ganfornina, M. D. (2008). Molecular interactions of the neuronal GPI-anchored lipocalin Lazarillo. *J Mol Recognit*, *21*(5), 313-323. doi:10.1002/jmr.902

- Sarjeant, J. M., Lawrie, A., Kinnear, C., Yablonsky, S., Leung, W., Massaelli, H., . . . Rabinovitch, M. (2003). Apolipoprotein D inhibits platelet-derived growth factor-BB-induced vascular smooth muscle cell proliferation by preventing translocation of phosphorylated extracellular signal regulated kinase 1/2 to the nucleus. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, *23*(12), 2172-2177. doi:10.1161/01.ATV.0000100404.05459.39
- Sasaki-Hamada, S., Ikeda, M., & Oka, J. I. (2019). Glucagon-like peptide-2 rescues memory impairments and neuropathological changes in a mouse model of dementia induced by the intracerebroventricular administration of streptozotocin. *Sci Rep*, *9*(1), 13723. doi:10.1038/s41598-019-50167-3
- Scheller, J., Chalaris, A., Schmidt-Arras, D., & Rose-John, S. (2011). The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochim Biophys Acta*, *1813*(5), 878-888. doi:10.1016/j.bbamcr.2011.01.034
- Scher, J. U., & Pillinger, M. H. (2005). 15d-PGJ2: the anti-inflammatory prostaglandin? *Clin Immunol*, *114*(2), 100-109. doi:10.1016/j.clim.2004.09.008
- Scherer, P. E., Bickel, P. E., Kotler, M., & Lodish, H. F. (1998). Cloning of cell-specific secreted and surface proteins by subtractive antibody screening. *Nat Biotechnol*, *16*(6), 581-586. doi:10.1038/nbt0698-581
- Schindler, P. A., Settineri, C. A., Collet, X., Fielding, C. J., & Burlingame, A. L. (1995). Site-specific detection and structural characterization of the glycosylation of human plasma proteins lecithin:cholesterol acyltransferase and apolipoprotein D using HPLC/electrospray mass spectrometry and sequential glycosidase digestion. *Protein Sci*, *4*(4), 791-803. doi:10.1002/pro.5560040419
- Schmid-Burgk, J. L., Chauhan, D., Schmidt, T., Ebert, T. S., Reinhardt, J., Endl, E., & Hornung, V. (2016). A Genome-wide CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) Screen Identifies NEK7 as an Essential Component of NLRP3 Inflammasome Activation. *J Biol Chem*, *291*(1), 103-109. doi:10.1074/jbc.C115.700492
- Séguin, D., Desforges, M., & Rassart, E. (1995). Molecular characterization and differential mRNA tissue distribution of mouse apolipoprotein D. *Molecular Brain Research*, *30*(2), 242-250. doi:10.1016/0169-328x(95)00008-g
- Serhan, C. N. (2017). Treating inflammation and infection in the 21st century: new hints from decoding resolution mediators and mechanisms. *FASEB J*, *31*(4), 1273-1288. doi:10.1096/fj.201601222R
- Serhan, C. N., & Levy, B. D. (2018). Resolvins in inflammation: emergence of the pro-resolving superfamily of mediators. *J Clin Invest*, *128*(7), 2657-2669. doi:10.1172/JCI97943
- Serhan, C. N., Yang, R., Martinod, K., Kasuga, K., Pillai, P. S., Porter, T. F., . . . Spite, M. (2009). Maresins: novel macrophage mediators with potent antiinflammatory and proresolving actions. *J Exp Med*, *206*(1), 15-23. doi:10.1084/jem.20081880

- Serra Diaz, C., Vizoso, F., Lamelas, M. L., Rodriguez, J. C., Gonzalez, L. O., Baltasar, A., & Medrano, J. (1999). Expression and clinical significance of apolipoprotein D in male breast cancer and gynaecomastia. *Br J Surg*, *86*(9), 1190-1197. doi:10.1046/j.1365-2168.1999.01157.x
- Sevin, M., Lesca, G., Baumann, N., Millat, G., Lyon-Caen, O., Vanier, M. T., & Sedel, F. (2007). The adult form of Niemann-Pick disease type C. *Brain*, *130*(Pt 1), 120-133. doi:10.1093/brain/awl260
- Sharma, J. N., & Mohammed, L. A. (2006). The role of leukotrienes in the pathophysiology of inflammatory disorders: is there a case for revisiting leukotrienes as therapeutic targets? *Inflammopharmacology*, *14*(1-2), 10-16. doi:10.1007/s10787-006-1496-6
- Sharma, N. P., Dong, L., Yuan, C., Noon, K. R., & Smith, W. L. (2010). Asymmetric acetylation of the cyclooxygenase-2 homodimer by aspirin and its effects on the oxygenation of arachidonic, eicosapentaenoic, and docosahexaenoic acids. *Mol Pharmacol*, *77*(6), 979-986. doi:10.1124/mol.109.063115
- Sherling, D. H., Perumareddi, P., & Hennekens, C. H. (2017). Metabolic Syndrome. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*, *22*(4), 365-367. doi:10.1177/1074248416686187
- Shi, C. S., Shenderov, K., Huang, N. N., Kabat, J., Abu-Asab, M., Fitzgerald, K. A., . . . Kehrl, J. H. (2012). Activation of autophagy by inflammatory signals limits IL-1beta production by targeting ubiquitinated inflammasomes for destruction. *Nat Immunol*, *13*(3), 255-263. doi:10.1038/ni.2215
- Shi, H., Wang, Y., Li, X., Zhan, X., Tang, M., Fina, M., . . . Beutler, B. (2016). NLRP3 activation and mitosis are mutually exclusive events coordinated by NEK7, a new inflammasome component. *Nat Immunol*, *17*(3), 250-258. doi:10.1038/ni.3333
- Shi, H., Zhang, Z., Wang, X., Li, R., Hou, W., Bi, W., & Zhang, X. (2015). Inhibition of autophagy induces IL-1beta release from ARPE-19 cells via ROS mediated NLRP3 inflammasome activation under high glucose stress. *Biochem Biophys Res Commun*, *463*(4), 1071-1076. doi:10.1016/j.bbrc.2015.06.060
- Shi, Y., & Vanhoutte, P. M. (2008). Oxidative stress and COX cause hyper-responsiveness in vascular smooth muscle of the femoral artery from diabetic rats. *Br J Pharmacol*, *154*(3), 639-651. doi:10.1038/bjp.2008.110
- Simard, J., Dauvois, S., Haagensen, D. E., Levesque, C., Merand, Y., & Labrie, F. (1990). Regulation of progesterone-binding breast cyst protein GCDP-24 secretion by estrogens and androgens in human breast cancer cells: a new marker of steroid action in breast cancer. *Endocrinology*, *126*(6), 3223-3231. doi:10.1210/endo-126-6-3223
- Simard, J., Veilleux, R., de Launoit, Y., Haagensen, D. E., & Labrie, F. (1991). Stimulation of apolipoprotein D secretion by steroids coincides with inhibition of cell proliferation in human LNCaP prostate cancer cells. *Cancer Res*, *51*(16), 4336-4341.

- Simopoulos, A. P. (2006). Evolutionary aspects of diet, the omega-6/omega-3 ratio and genetic variation: nutritional implications for chronic diseases. *Biomed Pharmacother*, *60*(9), 502-507. doi:10.1016/j.biopha.2006.07.080
- Simopoulos, A. P. (2016). An Increase in the Omega-6/Omega-3 Fatty Acid Ratio Increases the Risk for Obesity. *Nutrients*, *8*(3), 128. doi:10.3390/nu8030128
- Singh, G., & Triadafilopoulos, G. (1999). Epidemiology of NSAID induced gastrointestinal complications. *J Rheumatol Suppl*, *56*, 18-24.
- Smith, K. B., & Smith, M. S. (2016). Obesity Statistics. *Prim Care*, *43*(1), 121-135, ix. doi:10.1016/j.pop.2015.10.001
- Smith, K. M., Lawn, R. M., & Wilcox, J. N. (1990). Cellular localization of apolipoprotein D and lecithin:cholesterol acyltransferase mRNA in rhesus monkey tissues by in situ hybridization. *J Lipid Res*, *31*(6), 995-1004.
- Smith, P. C., Frank, H. A., Kasdon, E. J., Dearborn, E. C., & Skillman, J. J. (1978). Albumin uptake by skin, skeletal muscle and lung in living and dying patients. *Ann Surg*, *187*(1), 31-37. doi:10.1097/00000658-197801000-00007
- Smith, W. L., DeWitt, D. L., & Garavito, R. M. (2000). Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. *Annu Rev Biochem*, *69*, 145-182. doi:10.1146/annurev.biochem.69.1.145
- Soiland, H., Skaland, I., Varhaug, J. E., Korner, H., Janssen, E. A., Gudlaugsson, E., . . . Soreide, J. A. (2009). Co-expression of estrogen receptor alpha and Apolipoprotein D in node positive operable breast cancer--possible relevance for survival and effects of adjuvant tamoxifen in postmenopausal patients. *Acta Oncol*, *48*(4), 514-521. doi:10.1080/02841860802620613
- Sokolova, M., Sahraoui, A., Hoyem, M., Ogaard, J., Lien, E., Aukrust, P., . . . Scholz, H. (2018). NLRP3 inflammasome mediates oxidative stress-induced pancreatic islet dysfunction. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, *315*(5), E912-E923. doi:10.1152/ajpendo.00461.2017
- Sonnenburg, E. D., Smits, S. A., Tikhonov, M., Higginbottom, S. K., Wingreen, N. S., & Sonnenburg, J. L. (2016). Diet-induced extinctions in the gut microbiota compound over generations. *Nature*, *529*(7585), 212-215. doi:10.1038/nature16504
- Soto, M., Herzog, C., Pacheco, J. A., Fujisaka, S., Bullock, K., Clish, C. B., & Kahn, C. R. (2018). Gut microbiota modulate neurobehavior through changes in brain insulin sensitivity and metabolism. *Mol Psychiatry*. doi:10.1038/s41380-018-0086-5
- Spite, M., Claria, J., & Serhan, C. N. (2014). Resolvins, specialized proresolving lipid mediators, and their potential roles in metabolic diseases. *Cell Metab*, *19*(1), 21-36. doi:10.1016/j.cmet.2013.10.006
- Spreyer, P., Schaal, H., Kuhn, G., Rothe, T., Unterbeck, A., Olek, K., & Muller, H. W. (1990). Regeneration-associated high level expression of apolipoprotein D mRNA in endoneurial fibroblasts of peripheral nerve. *EMBO J*, *9*(8), 2479-2484.

- Stahelin, R. V. (2013). Surface plasmon resonance: a useful technique for cell biologists to characterize biomolecular interactions. *Mol Biol Cell*, *24*(7), 883-886. doi:10.1091/mbc.E12-10-0713
- Stahl, E. C., Delgado, E. R., Alencastro, F., LoPresti, S. T., Wilkinson, P. D., Roy, N., . . . Brown, B. N. (2020). Inflammation and Ectopic Fat Deposition in the Aging Murine Liver Is Influenced by CCR2. *Am J Pathol*, *190*(2), 372-387. doi:10.1016/j.ajpath.2019.10.016
- Statovci, D., Aguilera, M., MacSharry, J., & Melgar, S. (2017). The Impact of Western Diet and Nutrients on the Microbiota and Immune Response at Mucosal Interfaces. *Front Immunol*, *8*, 838. doi:10.3389/fimmu.2017.00838
- Steyrer, E., & Kostner, G. M. (1988). Activation of lecithin-cholesterol acyltransferase by apolipoprotein D: comparison of proteoliposomes containing apolipoprotein D, A-I or C-I. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism*, *958*(3), 484-491. doi:10.1016/0005-2760(88)90235-4
- Storer, P. D., Xu, J., Chavis, J. A., & Drew, P. D. (2005). Cyclopentenone prostaglandins PGA2 and 15-deoxy-delta12,14 PGJ2 suppress activation of murine microglia and astrocytes: implications for multiple sclerosis. *J Neurosci Res*, *80*(1), 66-74. doi:10.1002/jnr.20413
- Straus, D. S., & Glass, C. K. (2001). Cyclopentenone prostaglandins: new insights on biological activities and cellular targets. *Med Res Rev*, *21*(3), 185-210. doi:10.1002/med.1006
- Straus, D. S., Pascual, G., Li, M., Welch, J. S., Ricote, M., Hsiang, C.-H., . . . Glass, C. K. (2000). 15-Deoxy-D12,14-prostaglandin J2 inhibits multiple steps in the NF-kB signaling pathway. *PNAS*, *97*(9), 4844-4849.
- Straus, D. S., Pascual, G., Li, M., Welch, J. S., Ricote, M., Hsiang, C. H., . . . Glass, C. K. (2000). 15-Deoxy-Delta 12,14-prostaglandin J2 inhibits multiple steps in the NF-kappa B signaling pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *97*(9), 4844-4849. doi:10.1073/pnas.97.9.4844
- Strazielle, N., & Ghersi-Egea, J. F. (2013). Physiology of blood-brain interfaces in relation to brain disposition of small compounds and macromolecules. *Mol Pharm*, *10*(5), 1473-1491. doi:10.1021/mp300518e
- Sugimoto, Y., Namba, T., Honda, A., Hayashi, Y., Negishi, M., Ichikawa, A., & Narumiya, S. (1992). Cloning and expression of a cDNA for mouse prostaglandin E receptor EP3 subtype. *J Biol Chem*, *267*(10), 6463-6466.
- Suh, J., Kim, D. H., Kim, E. H., Park, S. A., Park, J. M., Jang, J. H., . . . Surh, Y. J. (2018). 15-Deoxy-Delta(12,14)-prostaglandin J2 activates PI3K-Akt signaling in human breast cancer cells through covalent modification of the tumor suppressor PTEN at cysteine 136. *Cancer Lett*, *424*, 30-45. doi:10.1016/j.canlet.2018.03.016
- Sun, B. L., Wang, L. H., Yang, T., Sun, J. Y., Mao, L. L., Yang, M. F., . . . Yang, X. Y. (2018). Lymphatic drainage system of the brain: A novel target for

- intervention of neurological diseases. *Prog Neurobiol*, 163-164, 118-143. doi:10.1016/j.pneurobio.2017.08.007
- Sun, H., Liu, Q., Hu, H., Jiang, Y., Shao, W., Wang, Q., . . . Gu, A. (2018). Berberine ameliorates blockade of autophagic flux in the liver by regulating cholesterol metabolism and inhibiting COX2-prostaglandin synthesis. *Cell Death Dis*, 9(8), 824. doi:10.1038/s41419-018-0890-5
- Sun, H., Wang, D., Liu, D., Guo, Z., Shao, C., Sun, W., & Zeng, Y. (2019). Differential urinary proteins to diagnose coronary heart disease based on iTRAQ quantitative proteomics. *Anal Bioanal Chem*, 411(11), 2273-2282. doi:10.1007/s00216-019-01668-7
- Sun, Y. Y., Li, X. F., Meng, X. M., Huang, C., Zhang, L., & Li, J. (2017). Macrophage Phenotype in Liver Injury and Repair. *Scand J Immunol*, 85(3), 166-174. doi:10.1111/sji.12468
- Suresh, S., Yan, Z., Patel, R. C., Patel, Y. C., & Patel, S. C. (1998). Cellular cholesterol storage in the Niemann-Pick disease type C mouse is associated with increased expression and defective processing of apolipoprotein D. *J Neurochem*, 70(1), 242-251. doi:10.1046/j.1471-4159.1998.70010242.x
- Surette, M. E., Winkler, J. D., Fonteh, A. N., & Chilton, F. H. (1996). Relationship between arachidonate--phospholipid remodeling and apoptosis. *Biochemistry*, 35(28), 9187-9196. doi:10.1021/bi9530245
- Suzuki, A., & Diehl, A. M. (2017). Nonalcoholic Steatohepatitis. *Annu Rev Med*, 68, 85-98. doi:10.1146/annurev-med-051215-031109
- Taba, Y., Sasaguri, T., Miyagi, M., Abumiya, T., Miwa, Y., Ikeda, T., & Mitsumata, M. (2000). Fluid Shear Stress Induces Lipocalin-Type Prostaglandin D2 Synthase Expression in Vascular Endothelial Cells. *Circulation Research*, 86(9), 967-973. doi:10.1161/01.Res.86.9.967
- Takeshita, Y., & Ransohoff, R. M. (2012). Inflammatory cell trafficking across the blood-brain barrier: chemokine regulation and in vitro models. *Immunol Rev*, 248(1), 228-239. doi:10.1111/j.1600-065X.2012.01127.x
- Talalay, P., De Long, M. J., & Prochaska, H. J. (1988). Identification of a common chemical signal regulating the induction of enzymes that protect against chemical carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85(21), 8261-8265. doi:10.1073/pnas.85.21.8261
- Tall, A. R. (2008). Cholesterol efflux pathways and other potential mechanisms involved in the athero-protective effect of high density lipoproteins. *J Intern Med*, 263(3), 256-273. doi:10.1111/j.1365-2796.2007.01898.x
- Tamura, M., Sebastian, S., Yang, S., Gurates, B., Fang, Z., & Bulun, S. E. (2002). Interleukin-1beta elevates cyclooxygenase-2 protein level and enzyme activity via increasing its mRNA stability in human endometrial stromal cells: an effect mediated by extracellularly regulated kinases 1 and 2. *J Clin Endocrinol Metab*, 87(7), 3263-3273. doi:10.1210/jcem.87.7.8594

- Tanaka, T., Narazaki, M., & Kishimoto, T. (2014). IL-6 in inflammation, immunity, and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 6(10), a016295. doi:10.1101/cshperspect.a016295
- Tanase-Nakao, K., Mizuno, K., Hayashi, Y., Kojima, Y., Hara, M., Matsumoto, K., . . . Fukami, M. (2019). Dihydrotestosterone induces minor transcriptional alterations in genital skin fibroblasts of children with and without androgen insensitivity. *Endocr J*, 66(4), 387-393. doi:10.1507/endocrj.EJ18-0494
- Tang, S., Gao, C., Long, Y., Huang, W., Chen, J., Fan, F., . . . Xu, Y. (2017). Maresin 1 Mitigates High Glucose-Induced Mouse Glomerular Mesangial Cell Injury by Inhibiting Inflammation and Fibrosis. *Mediators Inflamm*, 2017, 2438247. doi:10.1155/2017/2438247
- Tang, S., Wan, M., Huang, W., Stanton, R. C., & Xu, Y. (2018). Maresins: Specialized Proresolving Lipid Mediators and Their Potential Role in Inflammatory-Related Diseases. *Mediators Inflamm*, 2018, 2380319. doi:10.1155/2018/2380319
- Tang, W., Chang, S. B., & Hemler, M. E. (2004). Links between CD147 function, glycosylation, and caveolin-1. *Mol Biol Cell*, 15(9), 4043-4050. doi:10.1091/mbc.e04-05-0402
- Tchernof, A., & Despres, J. P. (2013). Pathophysiology of human visceral obesity: an update. *Physiol Rev*, 93(1), 359-404. doi:10.1152/physrev.00033.2011
- Teng, K. T., Chang, C. Y., Chang, L. F., & Nesaretnam, K. (2014). Modulation of obesity-induced inflammation by dietary fats: mechanisms and clinical evidence. *Nutr J*, 13, 12. doi:10.1186/1475-2891-13-12
- Terrisse, L., Marcoux, K., Do Carmo, S., Brissette, L., Milne, R., & Rassart, E. (2001). Structure-function relationships of human apolipoprotein D an immunochemical analysis. *Life Sci*, 70(6), 629-638. doi:10.1016/s0024-3205(01)01439-4
- Terrisse, L., Poirier, J., Bertrand, P., Merched, A., Visvikis, S., Siest, G., . . . Rassart, E. (1998). Increased levels of apolipoprotein D in cerebrospinal fluid and hippocampus of Alzheimer's patients. *J Neurochem*, 71(4), 1643-1650. doi:10.1046/j.1471-4159.1998.71041643.x
- Terrisse, L., Seguin, D., Bertrand, P., Poirier, J., Milne, R., & Rassart, E. (1999). Modulation of apolipoprotein D and apolipoprotein E expression in rat hippocampus after entorhinal cortex lesion. *Brain Res Mol Brain Res*, 70(1), 26-35. doi:10.1016/s0169-328x(99)00123-0
- Thomas, E. A., Copolov, D. L., & Sutcliffe, J. G. (2003). From pharmacotherapy to pathophysiology: emerging mechanisms of apolipoprotein D in psychiatric disorders. *Curr Mol Med*, 3(5), 408-418. doi:10.2174/1566524033479681
- Thomas, E. A., Dean, B., Pavey, G., & Sutcliffe, J. G. (2001). Increased CNS levels of apolipoprotein D in schizophrenic and bipolar subjects: implications for the pathophysiology of psychiatric disorders. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(7), 4066-4071. doi:10.1073/pnas.071056198

- Thomas, E. A., George, R. C., & Sutcliffe, J. G. (2003). Apolipoprotein D modulates arachidonic acid signaling in cultured cells: implications for psychiatric disorders. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 69(6), 421-427. doi:10.1016/j.plefa.2003.08.014
- Thomas, E. A., & Sutcliffe, J. G. (2002). The Neurobiology of Apolipoproteins in Psychiatric Disorders. *Molecular Neurobiology*, 26(2-3), 369-388. doi:10.1385/mn:26:2-3:369
- Thomas, E. A., & Yao, J. K. (2007). Clozapine specifically alters the arachidonic acid pathway in mice lacking apolipoprotein D. *Schizophr Res*, 89(1-3), 147-153. doi:10.1016/j.schres.2006.08.011
- Thomas, J. L., Jacob, L., & Boisserand, L. (2019). [Lymphatic system in central nervous system]. *Med Sci (Paris)*, 35(1), 55-61. doi:10.1051/medsci/2018309
- Thurnher, M., Putz, T., Gander, H., Rahm, A., Bartsch, G., & Ramoner, R. (2005). The cyclopentenone prostaglandin PGA2 costimulates the maturation of human dendritic cells. *Exp Hematol*, 33(2), 144-150. doi:10.1016/j.exphem.2004.11.012
- Tian, H., Lu, Y., Shah, S. P., & Hong, S. (2011). Autacoid 14S,21R-dihydroxydocosahexaenoic acid counteracts diabetic impairment of macrophage prohealing functions. *Am J Pathol*, 179(4), 1780-1791. doi:10.1016/j.ajpath.2011.06.026
- Tian, X. Y., Wong, W. T., Leung, F. P., Zhang, Y., Wang, Y. X., Lee, H. K., . . . Huang, Y. (2012). Oxidative stress-dependent cyclooxygenase-2-derived prostaglandin f(2alpha) impairs endothelial function in renovascular hypertensive rats. *Antioxid Redox Signal*, 16(4), 363-373. doi:10.1089/ars.2010.3874
- Tojo, A., & Kinugasa, S. (2012). Mechanisms of glomerular albumin filtration and tubular reabsorption. *Int J Nephrol*, 2012, 481520. doi:10.1155/2012/481520
- Tomita-Yamaguchi, M., Babich, J. F., Baker, R. C., & Santoro, T. J. (1990). Incorporation, distribution, and turnover of arachidonic acid within membrane phospholipids of B220+ T cells from autoimmune-prone MRL-lpr/lpr mice. *J Exp Med*, 171(3), 787-800. doi:10.1084/jem.171.3.787
- Tumani, H., Huss, A., & Bachhuber, F. (2017). The cerebrospinal fluid and barriers - anatomic and physiologic considerations. *Handb Clin Neurol*, 146, 21-32. doi:10.1016/B978-0-12-804279-3.00002-2
- Uhlen, M., Fagerberg, L., Hallstrom, B. M., Lindskog, C., Oksvold, P., Mardinoglu, A., . . . Ponten, F. (2015a). Proteomics. Tissue-based map of the human proteome. *Science*, 347(6220), 1260419. doi:10.1126/science.1260419
- Uhlen, M., Fagerberg, L., Hallstrom, B. M., Lindskog, C., Oksvold, P., Mardinoglu, A., . . . Ponten, F. (2015b). Tissue expression of PTGDS - Staining in liver. In *The Human Protein Atlas: The Human Protein Atlas*.
- Umemoto, T., & Fujiki, Y. (2012). Ligand-dependent nucleo-cytoplasmic shuttling of peroxisome proliferator-activated receptors, PPARalpha and PPARgamma. *Genes Cells*, 17(7), 576-596. doi:10.1111/j.1365-2443.2012.01607.x

- Unterberg, A., Wahl, M., & Baethmann, A. (1985). Arachidonic Acid Induces Opening of the Blood-Brain Barrier. In *Brain Edema* (pp. 159-164).
- Urade, Y., Ujihara, M., Horiguchi, Y., Ikai, K., & Hayaishi, O. (1989). The major source of endogenous prostaglandin D2 production is likely antigen-presenting cells. Localization of glutathione-requiring prostaglandin D synthetase in histiocytes, dendritic, and Kupffer cells in various rat tissues. *J Immunol*, *143*(9), 2982-2989.
- Vaddadi, K. S. (1992). Use of gamma-linolenic acid in the treatment of schizophrenia and tardive dyskinesia. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, *46*(1), 67-70. doi:10.1016/0952-3278(92)90062-n
- Vaisar, T., Pennathur, S., Green, P. S., Gharib, S. A., Hoofnagle, A. N., Cheung, M. C., . . . Heinecke, J. W. (2007). Shotgun proteomics implicates protease inhibition and complement activation in the antiinflammatory properties of HDL. *J Clin Invest*, *117*(3), 746-756. doi:10.1172/JCI26206
- Vance, J. E. (2012). Dysregulation of cholesterol balance in the brain: contribution to neurodegenerative diseases. *Dis Model Mech*, *5*(6), 746-755. doi:10.1242/dmm.010124
- Vandanmagsar, B., Youm, Y. H., Ravussin, A., Galgani, J. E., Stadler, K., Mynatt, R. L., . . . Dixit, V. D. (2011). The NLRP3 inflammasome instigates obesity-induced inflammation and insulin resistance. *Nat Med*, *17*(2), 179-188. doi:10.1038/nm.2279
- Varga, T., Czimmerer, Z., & Nagy, L. (2011). PPARs are a unique set of fatty acid regulated transcription factors controlling both lipid metabolism and inflammation. *Biochim Biophys Acta*, *1812*(8), 1007-1022. doi:10.1016/j.bbadis.2011.02.014
- Varlamov, O. (2017). Western-style diet, sex steroids and metabolism. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, *1863*(5), 1147-1155. doi:10.1016/j.bbadis.2016.05.025
- Vavere, A. L., & Welch, M. J. (2005). Preparation, biodistribution, and small animal PET of 45Ti-transferrin. *J Nucl Med*, *46*(4), 683-690.
- Vessieres, E., Guihot, A. L., Toutain, B., Maquigneau, M., Fassot, C., Loufrani, L., & Henrion, D. (2013). COX-2-derived prostanoids and oxidative stress additionally reduce endothelium-mediated relaxation in old type 2 diabetic rats. *PLoS One*, *8*(7), e68217. doi:10.1371/journal.pone.0068217
- Vieira, A. V., Lindstedt, K., Schneider, W. J., & Vieira, P. M. (1995). Identification of a circulatory and oocytic avian apolipoprotein D. *Mol Reprod Dev*, *42*(4), 443-446. doi:10.1002/mrd.1080420411
- Vijayaraghavan, S., Hitman, G. A., & Kopelman, P. G. (1994). Apolipoprotein-D polymorphism: a genetic marker for obesity and hyperinsulinemia. *J Clin Endocrinol Metab*, *79*(2), 568-570. doi:10.1210/jcem.79.2.7913935
- Villagomez, R., Hatti-Kaul, R., Sterner, O., Almanza, G., & Linares-Pasten, J. A. (2015). Effect of natural and semisynthetic pseudoguanolides on the stability

- of NF-kappaB:DNA complex studied by agarose gel electrophoresis. *PLoS One*, *10*(1), e0115819. doi:10.1371/journal.pone.0115819
- Viola, J. R., Lemnitzer, P., Jansen, Y., Csaba, G., Winter, C., Neideck, C., . . . Soehnlein, O. (2016). Resolving Lipid Mediators Maresin 1 and Resolvin D2 Prevent Atheroprogession in Mice. *Circ Res*, *119*(9), 1030-1038. doi:10.1161/CIRCRESAHA.116.309492
- Virtue, S., Feldmann, H., Christian, M., Tan, C. Y., Masoodi, M., Dale, M., . . . Vidal-Puig, A. (2012). A new role for lipocalin prostaglandin d synthase in the regulation of brown adipose tissue substrate utilization. *Diabetes*, *61*(12), 3139-3147. doi:10.2337/db12-0015
- Virtue, S., Masoodi, M., de Weijer, B. A., van Eijk, M., Mok, C. Y., Eiden, M., . . . Vidal-Puig, A. (2015). Prostaglandin profiling reveals a role for haematopoietic prostaglandin D synthase in adipose tissue macrophage polarisation in mice and humans. *Int J Obes (Lond)*, *39*(7), 1151-1160. doi:10.1038/ijo.2015.34
- Vivoli, E., Cappon, A., Milani, S., Piombanti, B., Provenzano, A., Novo, E., . . . Marra, F. (2016). NLRP3 inflammasome as a target of berberine in experimental murine liver injury: interference with P2X7 signalling. *Clin Sci (Lond)*, *130*(20), 1793-1806. doi:10.1042/CS20160400
- Vogt, M., & Skerra, A. (2001). Bacterially produced apolipoprotein D binds progesterone and arachidonic acid, but not bilirubin or E-3M2H. *Journal of Molecular Recognition*, *14*(1), 79-86. doi:10.1002/1099-1352(200101/02)14:1<79::Aid-jmr521>3.0.Co;2-4
- von Moltke, J., Ayres, J. S., Kofoed, E. M., Chavarria-Smith, J., & Vance, R. E. (2013). Recognition of bacteria by inflammasomes. *Annu Rev Immunol*, *31*, 73-106. doi:10.1146/annurev-immunol-032712-095944
- Wagner, S., Zensi, A., Wien, S. L., Tschickardt, S. E., Maier, W., Vogel, T., . . . von Briesen, H. (2012). Uptake mechanism of ApoE-modified nanoparticles on brain capillary endothelial cells as a blood-brain barrier model. *PLoS One*, *7*(3), e32568. doi:10.1371/journal.pone.0032568
- Wajchenberg, B. L. (2000). Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome. *Endocr Rev*, *21*(6), 697-738. doi:10.1210/edrv.21.6.0415
- Waldner, A., Dassati, S., Redl, B., Smania, N., & Gandolfi, M. (2018). Apolipoprotein D Concentration in Human Plasma during Aging and in Parkinson's Disease: A Cross-Sectional Study. *Parkinsons Dis*, *2018*, 3751516. doi:10.1155/2018/3751516
- Walker, D. W., Muffat, J., Rundel, C., & Benzer, S. (2006). Overexpression of a Drosophila homolog of apolipoprotein D leads to increased stress resistance and extended lifespan. *Curr Biol*, *16*(7), 674-679. doi:10.1016/j.cub.2006.01.057
- Walker, N. P., Fox, H. C., & Whalley, L. J. (1999). Lipids and schizophrenia. *Br J Psychiatry*, *174*, 101-104. doi:10.1192/bjp.174.2.101

- Wan, Q., Liu, Z., Yang, Y., & Cui, X. (2018). Suppressive effects of berberine on atherosclerosis via downregulating visfatin expression and attenuating visfatin-induced endothelial dysfunction. *Int J Mol Med*, *41*(4), 1939-1948. doi:10.3892/ijmm.2018.3440
- Wang, C., Pan, Y., Zhang, Q. Y., Wang, F. M., & Kong, L. D. (2012). Quercetin and allopurinol ameliorate kidney injury in STZ-treated rats with regulation of renal NLRP3 inflammasome activation and lipid accumulation. *PLoS One*, *7*(6), e38285. doi:10.1371/journal.pone.0038285
- Wang, J., & Wang, H. (2017). Oxidative Stress in Pancreatic Beta Cell Regeneration. *Oxid Med Cell Longev*, *2017*, 1930261. doi:10.1155/2017/1930261
- Wang, M., Zhang, X., Ma, L. J., Feng, R. B., Yan, C., Su, H., . . . Wan, J. B. (2017). Omega-3 polyunsaturated fatty acids ameliorate ethanol-induced adipose hyperlipolysis: A mechanism for hepatoprotective effect against alcoholic liver disease. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, *1863*(12), 3190-3201. doi:10.1016/j.bbadis.2017.08.026
- Wang, Y., Viscarra, J., Kim, S. J., & Sul, H. S. (2015). Transcriptional regulation of hepatic lipogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *16*(11), 678-689. doi:10.1038/nrm4074
- Warden, C. H., Anh, D., Taylor, B. A., & Lusis, A. J. (1992). Localization of the gene for apolipoprotein D on mouse chromosome 16. *Genomics*, *12*(4), 851-852. doi:10.1016/0888-7543(92)90325-m
- Watanabe, S., Kobayashi, T., & Okuyama, H. (1994). Regulation of lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor alpha production by endogenous prostaglandin E2 in rat resident and thioglycollate-elicited macrophages. *J Lipid Mediat Cell Signal*, *10*(3), 283-294.
- Watanabe, T., Dohgu, S., Takata, F., Nishioku, T., Nakashima, A., Futagami, K., . . . Kataoka, Y. (2013). Paracellular barrier and tight junction protein expression in the immortalized brain endothelial cell lines bEND.3, bEND.5 and mouse brain endothelial cell 4. *Biol Pharm Bull*, *36*(3), 492-495. doi:10.1248/bpb.b12-00915
- Weber, G. F., & Cantor, H. (1996). The immunology of Eta-1/osteopontin. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, *7*(3), 241-248. doi:10.1016/s1359-6101(96)00030-5
- Weech, P., Provost, P., Tremblay, N., Camato, R., Milne, R., Marcel, Y., & Rassart, E. (1991). Apolipoprotein D—An atypical apolipoprotein. *Progress in Lipid Research*, *30*(2-3), 259-266. doi:10.1016/0163-7827(91)90023-x
- Wei, Q., Mu, K., Li, T., Zhang, Y., Yang, Z., Jia, X., . . . Han, L. (2014). Deregulation of the NLRP3 inflammasome in hepatic parenchymal cells during liver cancer progression. *Lab Invest*, *94*(1), 52-62. doi:10.1038/labinvest.2013.126
- Weigert, C., Hennige, A. M., Brodbeck, K., Haring, H. U., & Schleicher, E. D. (2005). Interleukin-6 acts as insulin sensitizer on glycogen synthesis in human skeletal muscle cells by phosphorylation of Ser473 of Akt. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, *289*(2), E251-257. doi:10.1152/ajpendo.00448.2004

- Weitzmann, M. N. (2013). The Role of Inflammatory Cytokines, the RANKL/OPG Axis, and the Immunosteletal Interface in Physiological Bone Turnover and Osteoporosis. *Scientifica (Cairo)*, 2013, 125705. doi:10.1155/2013/125705
- Weller, R. O., Sharp, M. M., Christodoulides, M., Carare, R. O., & Mollgard, K. (2018). The meninges as barriers and facilitators for the movement of fluid, cells and pathogens related to the rodent and human CNS. *Acta Neuropathol*, 135(3), 363-385. doi:10.1007/s00401-018-1809-z
- Wen, H., Gris, D., Lei, Y., Jha, S., Zhang, L., Huang, M. T., . . . Ting, J. P. (2011). Fatty acid-induced NLRP3-ASC inflammasome activation interferes with insulin signaling. *Nat Immunol*, 12(5), 408-415. doi:10.1038/ni.2022
- West, R. B., Harvell, J., Linn, S. C., Liu, C. L., Prapong, W., Hernandez-Boussard, T., . . . van de Rijn, M. (2004). Apo D in soft tissue tumors: a novel marker for dermatofibrosarcoma protuberans. *Am J Surg Pathol*, 28(8), 1063-1069. doi:10.1097/01.pas.0000126857.86186.4c
- Wheeler, M. C., & Gekakis, N. (2014). Hsp90 modulates PPARgamma activity in a mouse model of nonalcoholic fatty liver disease. *J Lipid Res*, 55(8), 1702-1710. doi:10.1194/jlr.M048918
- White, P. J., St-Pierre, P., Charbonneau, A., Mitchell, P. L., St-Amand, E., Marcotte, B., & Marette, A. (2014). Protectin DX alleviates insulin resistance by activating a myokine-liver glucoregulatory axis. *Nat Med*, 20(6), 664-669. doi:10.1038/nm.3549
- Widen, J. C., Kempema, A. M., Baur, J. W., Skopec, H. M., Edwards, J. T., Brown, T. J., . . . Harki, D. A. (2018). Helenalin Analogues Targeting NF-kappaB p65: Thiol Reactivity and Cellular Potency Studies of Varied Electrophiles. *ChemMedChem*, 13(4), 303-311. doi:10.1002/cmdc.201700752
- Wilson, C. G., Tran, J. L., Erion, D. M., Vera, N. B., Febbraio, M., & Weiss, E. J. (2016). Hepatocyte-Specific Disruption of CD36 Attenuates Fatty Liver and Improves Insulin Sensitivity in HFD-Fed Mice. *Endocrinology*, 157(2), 570-585. doi:10.1210/en.2015-1866
- Wolf, L. A., & Laster, S. M. (1999). Characterization of arachidonic acid-induced apoptosis. *Cell Biochem Biophys*, 30(3), 353-368. doi:10.1007/BF02738119
- Wong, B. C., Wang, W. P., Cho, C. H., Fan, X. M., Lin, M. C., Kung, H. F., & Lam, S. K. (2001). 12-Lipoxygenase inhibition induced apoptosis in human gastric cancer cells. *Carcinogenesis*, 22(9), 1349-1354. doi:10.1093/carcin/22.9.1349
- Woods, S., Seeley, R., Baskin, D., & Schwartz, M. (2003). Insulin and the Blood-Brain Barrier. *Current Pharmaceutical Design*, 9(10), 795-800. doi:10.2174/1381612033455323
- Wu, M., Chen, C., Wang, Z., Bachman, H., Ouyang, Y., Huang, P. H., . . . Huang, T. J. (2019). Separating extracellular vesicles and lipoproteins via acoustofluidics. *Lab Chip*, 19(7), 1174-1182. doi:10.1039/c8lc01134f

- Wu, M., Han, W., Song, S., Du, Y., Liu, C., Chen, N., . . . Duan, H. (2018). NLRP3 deficiency ameliorates renal inflammation and fibrosis in diabetic mice. *Mol Cell Endocrinol*, 478, 115-125. doi:10.1016/j.mce.2018.08.002
- Xiang, J., Wang, Z. H., Ahn, E. H., Liu, X., Yu, S. P., Manfredsson, F. P., . . . Ye, K. (2019). Delta-secretase-cleaved Tau antagonizes TrkB neurotrophic signalings, mediating Alzheimer's disease pathologies. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 116(18), 9094-9102. doi:10.1073/pnas.1901348116
- Xin, X., Zeng, X., Gu, H., Li, M., Tan, H., Jin, Z., . . . Wang, H. (2016). CD147/EMMPRIN overexpression and prognosis in cancer: A systematic review and meta-analysis. *Sci Rep*, 6, 32804. doi:10.1038/srep32804
- Xu, H., Fu, J. L., Miao, Y. F., Wang, C. J., Han, Q. F., Li, S., . . . Guan, Y. F. (2016). Prostaglandin E2 receptor EP3 regulates both adipogenesis and lipolysis in mouse white adipose tissue. *J Mol Cell Biol*, 8(6), 518-529. doi:10.1093/jmcb/mjw035
- Yagisawa, H., & Osawa, T. (1982). Guinea-pig lymphotoxin-mediated cytotoxicity and activation of endogenous phospholipase A2. *Immunology*, 47(3), 437-447.
- Yamamoto, S. (1999). Biosynthesis and Metabolism of Eicosanoids. In *Comprehensive Natural Products Chemistry* (pp. 255-271).
- Yamashita, A. S., Belchior, T., Lira, F. S., Bishop, N. C., Wessner, B., Rosa, J. C., & Festuccia, W. T. (2018). Regulation of Metabolic Disease-Associated Inflammation by Nutrient Sensors. *Mediators Inflamm*, 2018, 8261432. doi:10.1155/2018/8261432
- Yan, Z., Qu, K., Zhang, J., Huang, Q., Qu, P., Xu, X., . . . Xing, J. (2015). CD147 promotes liver fibrosis progression via VEGF-A/VEGFR2 signalling-mediated cross-talk between hepatocytes and sinusoidal endothelial cells. *Clin Sci (Lond)*, 129(8), 699-710. doi:10.1042/CS20140823
- Yang, B., Verbavatz, J. M., Song, Y., Vetrivel, L., Manley, G., Kao, W. M., . . . Verkman, A. S. (2000). Skeletal muscle function and water permeability in aquaporin-4 deficient mice. *Am J Physiol Cell Physiol*, 278(6), C1108-1115. doi:10.1152/ajpcell.2000.278.6.C1108
- Yang, C. A., & Chiang, B. L. (2015). Inflammasomes and human autoimmunity: A comprehensive review. *J Autoimmun*, 61, 1-8. doi:10.1016/j.jaut.2015.05.001
- Yang, C. Y., Gu, Z. W., Blanco-Vaca, F., Gaskell, S. J., Yang, M., Massey, J. B., . . . Pownall, H. J. (1994). Structure of human apolipoprotein D: locations of the intermolecular and intramolecular disulfide links. *Biochemistry*, 33(41), 12451-12455. doi:10.1021/bi00207a011
- Yang, S., Mei, S., Jin, H., Zhu, B., Tian, Y., Huo, J., . . . Zhao, Z. (2017). Identification of two immortalized cell lines, ECV304 and bEnd3, for in vitro permeability studies of blood-brain barrier. *PLoS One*, 12(10), e0187017. doi:10.1371/journal.pone.0187017
- Yao, J. K., Thomas, E. A., Reddy, R. D., & Keshavan, M. S. (2005). Association of plasma apolipoproteins D with RBC membrane arachidonic acid levels in

- schizophrenia. *Schizophr Res*, 72(2-3), 259-266. doi:10.1016/j.schres.2004.05.007
- Yao, J. K., van Kammen, D. P., & Gurklis, J. A. (1996). Abnormal incorporation of arachidonic acid into platelets of drug-free patients with schizophrenia. *Psychiatry Research*, 60(1), 11-21. doi:10.1016/0165-1781(95)02832-3
- Yao, Y., & Vieira, A. (2002). Comparative 17 β -estradiol response and lipoprotein interactions of an avian apolipoprotein. *General and Comparative Endocrinology*, 127(1), 89-93. doi:10.1016/s0016-6480(02)00032-1
- Yates, C. M., Calder, P. C., & Ed Rainger, G. (2014). Pharmacology and therapeutics of omega-3 polyunsaturated fatty acids in chronic inflammatory disease. *Pharmacol Ther*, 141(3), 272-282. doi:10.1016/j.pharmthera.2013.10.010
- Yokomizo, T., Nakamura, M., & Shimizu, T. (2018). Leukotriene receptors as potential therapeutic targets. *J Clin Invest*, 128(7), 2691-2701. doi:10.1172/JCI97946
- Yoshida, K., Cleaveland, E. S., Nagle, J. W., French, S., Yaswen, L., Ohshima, T., . . . Kulkarni, A. B. (1996). Molecular cloning of the mouse apolipoprotein D gene and its upregulated expression in Niemann-Pick disease type C mouse model. *DNA Cell Biol*, 15(10), 873-882. doi:10.1089/dna.1996.15.873
- Youm, Y. H., Adijiang, A., Vandanmagsar, B., Burk, D., Ravussin, A., & Dixit, V. D. (2011). Elimination of the NLRP3-ASC inflammasome protects against chronic obesity-induced pancreatic damage. *Endocrinology*, 152(11), 4039-4045. doi:10.1210/en.2011-1326
- Yu, X., Hao, M., Liu, Y., Ma, X., Lin, W., Xu, Q., . . . Kuang, H. (2019). Liraglutide ameliorates non-alcoholic steatohepatitis by inhibiting NLRP3 inflammasome and pyroptosis activation via mitophagy. *Eur J Pharmacol*, 864, 172715. doi:10.1016/j.ejphar.2019.172715
- Zeng, C., Spielman, A. I., Vowels, B. R., Leyden, J. J., Biemann, K., & Preti, G. (1996). A human axillary odorant is carried by apolipoprotein D. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(13), 6626-6630. doi:10.1073/pnas.93.13.6626
- Zhang, C., Klett, E. L., & Coleman, R. A. (2013). Lipid signals and insulin resistance. *Clin Lipidol*, 8(6), 659-667. doi:10.2217/clp.13.67
- Zhang, J., He, Q., Liu, Q. Y., Guo, W., Deng, X. M., Zhang, W. W., . . . Li, N. (2007). Differential gene expression profile in pig adipose tissue treated with/without clenbuterol. *BMC Genomics*, 8, 433. doi:10.1186/1471-2164-8-433
- Zhang, R., Pan, X., Huang, Z., Weber, G. F., & Zhang, G. (2011). Osteopontin enhances the expression and activity of MMP-2 via the SDF-1/CXCR4 axis in hepatocellular carcinoma cell lines. *PLoS One*, 6(8), e23831. doi:10.1371/journal.pone.0023831
- Zhang, S. X. D., Bentel, J. M., Ricciardelli, C., Horsfall, D. J., Haagenen, D. E., Marshall, V. R., & Tilley, W. D. (1998). Immunolocalization of Apolipoprotein D, Androgen Receptor and Prostate Specific Antigen in Early Stage Prostate Cancers. *Journal of Urology*, 159(2), 548-554. doi:10.1016/s0022-5347(01)63981-8

- Zhang, X., Dai, J., Li, L., Chen, H., & Chai, Y. (2017). NLRP3 Inflammasome Expression and Signaling in Human Diabetic Wounds and in High Glucose Induced Macrophages. *J Diabetes Res*, 2017, 5281358. doi:10.1155/2017/5281358
- Zhao, G., Dharmadhikari, G., Maedler, K., & Meyer-Hermann, M. (2014). Possible role of interleukin-1beta in type 2 diabetes onset and implications for anti-inflammatory therapy strategies. *PLoS Comput Biol*, 10(8), e1003798. doi:10.1371/journal.pcbi.1003798
- Zheng, X. Y., Zhang, H. L., Luo, Q., & Zhu, J. (2011). Kainic acid-induced neurodegenerative model: potentials and limitations. *J Biomed Biotechnol*, 2011, 457079. doi:10.1155/2011/457079
- Zhong, F. L., Mamai, O., Sborgi, L., Boussofara, L., Hopkins, R., Robinson, K., . . . Reversade, B. (2016). Germline NLRP1 Mutations Cause Skin Inflammatory and Cancer Susceptibility Syndromes via Inflammasome Activation. *Cell*, 167(1), 187-202 e117. doi:10.1016/j.cell.2016.09.001
- Zhou, R., Yazdi, A. S., Menu, P., & Tschopp, J. (2011). A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. *Nature*, 469(7329), 221-225. doi:10.1038/nature09663
- Zigmond, E., Samia-Grinberg, S., Pasmanik-Chor, M., Brazowski, E., Shibolet, O., Halpern, Z., & Varol, C. (2014). Infiltrating monocyte-derived macrophages and resident kupffer cells display different ontogeny and functions in acute liver injury. *J Immunol*, 193(1), 344-353. doi:10.4049/jimmunol.1400574
- Zozulinska, D., & Wierusz-Wysocka, B. (2006). Type 2 diabetes mellitus as inflammatory disease. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 74(2), S12-S16. doi:10.1016/j.diabres.2006.06.007
- Zuchero, Y. J., Chen, X., Bien-Ly, N., Bumbaca, D., Tong, R. K., Gao, X., . . . Watts, R. J. (2016). Discovery of Novel Blood-Brain Barrier Targets to Enhance Brain Uptake of Therapeutic Antibodies. *Neuron*, 89(1), 70-82. doi:10.1016/j.neuron.2015.11.024
- Zweers, M. C., de Boer, T. N., van Roon, J., Bijlsma, J. W., Lafeber, F. P., & Mastbergen, S. C. (2011). Celecoxib: considerations regarding its potential disease-modifying properties in osteoarthritis. *Arthritis Res Ther*, 13(5), 239. doi:10.1186/ar3437