UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

MISE EN ÉVIDENCE DES PROPRIÉTÉS PRÉVENTIVES ET CURATIVES DES LIPIDES À CHAÎNES MOYENNES CONTRE L'OBÉSITÉ ET LA STÉATOSE HÉPATIQUE NON ALCOOLIQUE

THÈSE

PRÉSENTÉE

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DU DOCTORAT EN BIOLOGIE

PAR

AHMED SABRI RIAL

JUIN 2020

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL Service des bibliothèques

<u>Avertissement</u>

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.10-2015). 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.»

« Ceux qui par la science vont au plus haut du monde Qui par leur intelligence, scrutent le fond des cieux Ceux-là, pareils à la coupe du ciel La tête renversée, vivent dans leur vertige. »

(Omar Khayyâm, Les Rubâ'iyyât)

« Choisissez un travail que vous aimez et vous n'aurez pas à travailler un seul jour de votre vie. »

(Sagesse attribuée à Confucius)

Est-ce vrai, est-ce bon, est-ce utile ?

REMERCIEMENTS

Un sage ami (Jean Paul Adje) m'a dit un jour, tandis que nous savourions le sentiment d'allégresse que nous procurait notre fraiche diplomation de premier cycle en biologie, cette phrase si simple mais tellement vraie : Il y a toujours du miel au bout de l'effort.

Aujourd'hui, c'est un sentiment de fierté et un état de vive satisfaction qui s'emparent de moi lorsque je parcours les pages de cette thèse qui raconte les strates successives de mon apprentissage et de mes humbles contributions à l'avancement des connaissances. C'est le miel.

Mais il y a eu l'effort en amont. Et cet effort fut collectif. Plusieurs personnes ont contribué, de près ou de loin, à l'aboutissement de ma thèse, et je tiens à toutes les remercier.

La première personne que je tiens à remercier le plus chaleureusement et le plus sincèrement du monde est le docteure Catherine Mounier. Il y a des personnes qui, bien au-delà de leurs innombrables habiletés professionnelles et intellectuelles (qu'il ne serait même pas nécessaire d'évoquer tant elles relèvent de l'évidence dans le cas de Catherine), couvent dans leur cœur une qualité fondamentalement unique : celle de savoir déceler et croire au potentiel d'autrui plus qu'il n'y croirait lui-même. Pour cela, Catherine que j'ai plus d'une fois appelée « ma maman scientifique », est un mentor unique. Catherine, merci de m'avoir appris à croire en mes capacités. Quel que soit l'élan que prendra la course de ma carrière, je me souviendrai toujours que c'est toi qui m'as mis les pieds à l'étrier. Ma manière de te rendre hommage sera de faire pareil avec ceux que j'aurais, peut-être un jour, l'occasion de former.

Lorsque Catherine a accepté de m'offrir la chance de réaliser un stage d'initiation à la recherche dans le labo (c'était en 2012 et la folie était autorisée car nous pensions la

fin du monde proche) qui allait ensuite devenir un parcours de maîtrise et de doctorat, c'est au brave Dr. Amine Lounis (alors pas encore docteur mais déjà Papi) qu'incomba la tâche de me former. Très vite, notre relation professionnelle s'est transformée en une grande amitié qui dure toujours. Merci, Amine, de ta grande bienveillance tant sur le plan professionnel que personnel. Dieu bénisse et protège ta merveilleuse petite famille qui te donne tant de satisfaction et que j'aime tant !

Durant mon doctorat, j'ai eu le privilège immense de former plusieurs stagiaires en les impliquant directement dans la réalisation de mes expériences. Toutes et tous ont contribué significativement à l'élaboration de mes deux principaux articles scientifiques. Je tiens à remercier du fond du cœur (et à les féliciter pour les belles carrières qu'ils(elles) se bâtissent en ce moment même) Lauranne Bouteille, Mihai Bica, Nathalie Pesin, Sarah-Clohé Lacoste, Marine Normand, Tommy Malaret, Maxime Borret, Marie-Êve Jodoin et Antoine Jutras-Carignan.

Dans ce collectif, il y avait une personne de rare talent qui a su, en me transmettant son sens unique de la rigueur, de la précision, de l'exactitude, de la perfection et de la rectitude qui doivent définir tout esprit cartésien (n'est-ce pas, après tout, ce que nous ambitionnons d'atteindre en tant que doctorant ?), me ramener sur Terre lorsque je m'envolais en Icare candide, et me combler d'enthousiasme lorsqu'enfin il le fallait. Le mental du chercheur, comme celui de l'athlète, requiert un apprentissage en soi. Je remercie le docteur Karl-Frédérik Bergeron de me l'avoir transmis. Karl et moi ne comptions pas les heures lorsque nous sélectionnions avec la plus haute rigueur nos modèles biologiques, nos réactifs, nos diètes pour souris, nos moindres formulations de textes. Karl, si mes deux articles de recherche et ma revue de littérature ont systématiquement été acceptés par nos pairs avec des révisions franchement mineures, c'est en immense partie à toi que je le dois. Merci infiniment ! Je ne manquerai sûrement pas de rappeler combien l'ambiance du labo Mounier a été propice à mon épanouissement. La bonne ambiance au sein de notre équipe est ce qui la rend, à mes yeux, si unique ! Depuis le début, tous les matins j'ai eu l'impression de quitter mes parents et ma sœur pour retrouver, 20 kilomètres plus loin, mes autres frères et sœurs. Entre nous, dans la vie professionnelle comme dans la vie personnelle, l'amitié, la bienveillance, l'entraide et l'affection ont valeur de crédo. Mes très chers amis Amine Lounis (c'est vrai je l'ai déjà mentionné mais on n'abuse jamais des bonnes choses), Giselle Fernandez, Frédérik Desmarais, Simon Lalonde, Alexandre Légiot, Marine Lingrand, Gaetan Ravaut, Antoine Jutras-Carignan, merci de votre belle amitié. Puisse-t-elle perdurer.

Mon cheminement de doctorat a été l'occasion de rencontrer de grands passionnés généreux de leur savoir. Ils m'ont tant appris ! Julie Lafond, Tatiana Scorza, Daniel Lemieux, Roland Savard, François Dragon, merci de m'avoir impliqué dans vos activités d'enseignement. Grâce à vous, je suis convaincu que la carrière d'enseignant chercheur est celle que je désire le plus entreprendre. Mme Sophie Malavoy, je vous remercie de m'avoir donné quelques bons conseils pour parvenir à bien vulgariser ma science. C'est là aussi une activité passionnante qu'il m'a fait plaisir de démystifier.

Je tiens à remercier Le Fonds de recherche du Québec–Nature et technologie (FRQNT), ainsi que le programme de bourses de la Fondation de l'UQAM, d'avoir cru en mes capacités en m'ayant décerné de prestigieuses bourses d'excellence.

Du plus loin que je me souvienne, Papa, Maman, quels que fussent les contextes, vous avez toujours fait en sorte que Meriem (Mimi) et moi ne manquions de rien ! Plus encore, jamais vous n'avez transigé sur notre accès au savoir et à l'éducation. Je sais grâce à vous que c'est la seule véritable richesse. Mimi et moi imaginons, maintenant que nous avons grandi et que nous nous sommes attachés à notre entourage, combien il a dû être pénible pour vous de vous déraciner pour nous offrir l'accès à des études universitaires de qualité. Papa, Maman, je vous dédie cette thèse pour vous prouver que vous ne vous êtes pas trompés. Chaque jour j'espère vous rendre un peu plus fiers. Et puis, il y a notre si belle et chère Province qui rend tout si agréable !

Mimi, ma chère sœur, que ce soit pour des covoiturages matinaux ou pour tout le soutien dont tu auras besoin pour poursuivre ton propre cheminement aux cycles supérieurs, je voudrais être là pour te remercier de toute ton affection.

Cette thèse est la première véritable passion que j'ai eu à vivre pleinement et jusqu'au bout. J'ai notamment appris la véritable définition des passions dévorantes. Elles ne nous dévorent pas, mais elles s'entre-dévorent.

Je veux dédier cette thèse à Mani, ma grand-mère paternelle qu'il me tarde de revoir, mais aussi à mes chers et regrettés Djedou, mon grand-père paternel, Djedou, mon grand-père maternel, et Mamie, ma grand-mère maternelle. Il m'a toujours suffi de penser à leur riche vécu pour que s'envolent la paresse et la tentation du moindre effort.

Pour finir, je tiens à rendre hommage à toutes les adorables et innocentes petites boules de poils, meilleures amies de l'homme à blouse blanche : aux soixante-quatre souris sacrifiées pour le bon avancement de la présente thèse et qui ne quitteront jamais ma mémoire, ainsi qu'à tous les animaux dont on ôte la vie pour améliorer les conditions de la nôtre, merci, et pardon !

À mes parents, et à ma sœur

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES TABLEAUX	LIS	LISTE DES FIGURESxiii		
LISTE DES ABRÉVIATIONS xvii Liste des symboles et des unités xx RÉSUMÉ xxv CHAPITRE I xxv Etat des connaissances 1 1.1 Introduction 1.2 Aperçu général des lipides et de leurs fonctions 1.2.1 Les lipides : définitions et fonctions générales 1.2.2 Une définition du métabolisme des lipides 1.3 L'anabolisme des lipides 1.3.1 La captation des acides gras 1.3.2 La régulation de la captation des acides gras 1.3.3 La lipogenèse <i>de novo</i> (DNL) 1.3.4 La régulation transcriptionnelle des effecteurs de la DNL 1.3.5 La régulation hormonale et nutritionnelle de la DNL 1.4 Le transport systémique des lipoprotéines 21.5 Le catabolisme des lipides 22 Les voies d'oxydation des acides gras 3.5 La vioi de la lipophagie	LIS	TE DES	S TABLEAUXxvii	
Liste des symboles et des unités xxx RÉSUMÉ xxv CHAPITRE I Etat des connaissances 1.1 Introduction 1.2 Aperçu général des lipides et de leurs fonctions 1.2.1 Les lipides : définitions et fonctions générales 1.2.2 Une définition du métabolisme des lipides 1.3 L'anabolisme des lipides 1.3.1 La captation des acides gras 1.3.2 La régulation de la captation des acides gras 1.3.3 La lipogenèse de novo (DNL) 1.3.4 La régulation hormonale et nutritionnelle de la DNL 1.3.5 La régulation hormonale et nutritionnelle de la DNL 1.4 Le transport systémique des lipoprotéines 22 1.5.1 La lipolyse neutre 23 La voie de la lipophagie 24	LIS	TE DES	S ABRÉVIATIONSxviii	
RÉSUMÉ xxv CHAPITRE I Etat des connaissances 1.1 Introduction 1.2 Aperçu général des lipides et de leurs fonctions 1.2.1 Les lipides : définitions et fonctions générales 1.2.2 Une définition du métabolisme des lipides 1.3 L'anabolisme des lipides 1.3.1 La captation des acides gras 1.3.2 La régulation de la captation des acides gras 1.3.3 La lipogenèse <i>de novo</i> (DNL) 1.3.4 La régulation hormonale et nutritionnelle de la DNL 1.3.5 La régulation hormonale et nutritionnelle de la DNL 1.4 Le transport systémique des lipoprotéines 1.5 Le catabolisme des lipides 21 1.5 1.5 La voie de la lipophagie	List	e des sy	mboles et des unitésxxv	
CHAPITRE I Etat des connaissances 1.1 Introduction 1.2 Aperçu général des lipides et de leurs fonctions 1.2.1 Les lipides : définitions et fonctions générales 1.2.2 Une définition du métabolisme des lipides 1.3 L'anabolisme des lipides 1.3.1 La captation des acides gras 1.3.2 La régulation de la captation des acides gras 1.3.3 La lipogenèse <i>de novo</i> (DNL) 1.3.4 La régulation transcriptionnelle des effecteurs de la DNL 1.3.5 La régulation hormonale et nutritionnelle de la DNL 1.4 Le transport systémique des lipoprotéines 22 1.5 Le catabolisme des lipides 23 1.5.1 La lipolyse neutre 24 25.3 La voie de la lipophagie	RÉS	SUMÉ .	xxvi	
Etat des connaissances 1.1 Introduction 1.2 Aperçu général des lipides et de leurs fonctions 1.2.1 Les lipides : définitions et fonctions générales 1.2.2 Une définition du métabolisme des lipides 1.3 L'anabolisme des lipides 1.3.1 La captation des acides gras 1.3.2 La régulation de la captation des acides gras 1.3.3 La lipogenèse de novo (DNL) 1.3.4 La régulation transcriptionnelle des effecteurs de la DNL 1.3.5 La régulation hormonale et nutritionnelle de la DNL 1.4 Le transport systémique des lipoprotéines 1.5 Le catabolisme des lipides 21 1.5 1.5 Le sovies d'oxydation des acides gras 1.5 Les voies d'oxydation des acides gras	CH	APITRE	E I1	
1.1 Introduction. 1.2 Aperçu général des lipides et de leurs fonctions	Etat	t des cor	nnaissances	
1.2 Aperçu général des lipides et de leurs fonctions	1.1	Introc	luction1	
1.2.1 Les lipides : définitions et fonctions générales 4 1.2.2 Une définition du métabolisme des lipides 6 1.3 L'anabolisme des lipides 6 1.3 L arabolisme des lipides 6 1.3.1 La captation des acides gras 6 1.3.2 La régulation de la captation des acides gras 10 1.3.3 La lipogenèse de novo (DNL) 12 1.3.4 La régulation transcriptionnelle des effecteurs de la DNL 19 1.3.5 La régulation hormonale et nutritionnelle de la DNL 20 1.4 Le transport systémique des lipoprotéines 22 1.5 Le catabolisme des lipides 22 1.5.1 La lipolyse neutre 22 1.5.2 Les voies d'oxydation des acides gras 30 1.5.3 La voie de la lipophagie 30	1.2	Aperç	zu général des lipides et de leurs fonctions4	
 1.3 L'anabolisme des lipides		1.2.1 1.2.2	Les lipides : définitions et fonctions générales	
1.3.1 La captation des acides gras 10 1.3.2 La régulation de la captation des acides gras 10 1.3.3 La lipogenèse de novo (DNL) 11 1.3.4 La régulation transcriptionnelle des effecteurs de la DNL 11 1.3.5 La régulation hormonale et nutritionnelle de la DNL 12 1.4 Le transport systémique des lipoprotéines 22 1.5 Le catabolisme des lipides 22 1.5.1 La lipolyse neutre 22 1.5.2 Les voies d'oxydation des acides gras 30 1.5.3 La voie de la lipophagie 30	1.3	L'ana	bolisme des lipides6	
1.4 Le transport systémique des lipoprotéines		1.3.1 1.3.2 1.3.3 1.3.4 1.3.5	La captation des acides gras	
1.5 Le catabolisme des lipides 2: 1.5.1 La lipolyse neutre 2: 1.5.2 Les voies d'oxydation des acides gras 3: 1.5.3 La voie de la lipophagie 3:	1.4	Le tra	nsport systémique des lipoprotéines22	
 1.5.1 La lipolyse neutre	1.5	Le ca	tabolisme des lipides25	
 1.5.4 L'acétyl-CoA, la monnaie d'échange énergétique des cellules		1.5.1 1.5.2 1.5.3 1.5.4 1.5.5	La lipolyse neutre	
1.5.0 La regulation de la dienniegenese nois deuvice physique	1.6	La rég	gulation de la balance catabolisme/anabolisme des lipides	
	1.6	La rég	gulation de la balance catabolisme/anabolisme des lipides61	

	1.6.1 l'homé 1.6.2 à l'hom	L' <i>AMP-activated kinase</i> (AMPK), pivot régulateur maître d ostasie du métabolisme des lipides	e 1 5) 7
1.7	Les e	ffets délétères du débalancement du métabolisme des lipides7	1
	1.7.1 1.7.2 1.7.3	L'obésité	1 8 5
1.8	La lut	tte contre les maladies métaboliques <i>via</i> la nutraceutique9	0
	1.8.1 1.8.2	Les caractéristiques générales des lipides à chaînes moyennes	1 2
1.9	Probl	ématique et objectifs9	9
CH hép	APITRI atocytes	E II L'innocuité des acides gras à chaînes moyennes vis-à-vis des	2
2.1	Résur	né10	5
2.2	Abstr	act	6
2.3	Introd	luction10	7
2.4	Mater	rials and methods	0
	2.4.1 2.4.2 2.4.3 2.4.4 2.4.5 2.4.6 2.4.7 2.4.8 analysi 2.4.9 2.4.10 2.4.11	Cells, chemicals and reagents11Fatty acid conjugation to bovine serum albumin11Cell culture11MTT cell viability assay11Mitochondrial membrane potential measurment11Lipid droplet staining11Western blot analysis11Quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR s113Oleate oxidation assay11Glucose uptake assay11Statistical analysis11	0 1 1 1 2 2 3 3 3 4 4 5
2.5	Resul	ts	6
	2.5.1 Effects 2.5.2 de Nov 2.5.3	Medium Chain Fatty Acids are not Cytotoxic but Induce Differentia on Mitochondria	ıl 6 7

	2.5.4 mTOR	Medium Chain Fatty Acids Maintain Insulin Sensitivity and Foster AKT- Axis Activation
2.6	Discu	ssion119
	2.6.1 2.6.2 2.6.3	Differential effects of MCFA on mitochondria
2.7	Concl	usion
2.8	Ackm	owledgments
2.9	Confl	icts of interest125
2.10) Suppl	ementary materials
2.1	l Fundi	ng125
2.12	2 Figure	e legends
2.13	3 Table	s
CH hép 3.1	APITRE atique to Résur	E III Les triglycérides à chaînes moyennes induisent la thermogenèse put en favorisant la bonne santé métabolique
3.2	Abstr	act
3.3	Introd	uction
3.4	Mater	ials and methods145
	3.4.1 3.4.2 3.4.3 3.4.4 3.4.5 3.4.6 3.4.7 3.4.8 3.4.9	Mice and diets145Body weight, food and energy intake146Glucose homeostasis146Circulating markers147Histology147Western blots147Cell culture and treatments148RNA extraction and quantitative PCR148Statistical analysis149
3.5	Resul	ts
	3.5.1 insulin 3.5.2 3.5.3 thermo	A high-fat diet enriched in MCT does not adversely affect body weight or sensitivity

3.5.4 A high-fat diet enriched in MCT does not trigger WAT expansion 152
3.5.5 Body weight and insulin resistance are reduced in metabolically unhealthy
obese mice raised on a high-fat diet enriched in MCT
3.5.6 A high-fat diet enriched in MCT improves steatosis and stimulates the
expression of thermogenesis markers in the liver of obese animals
of obese mice on a MCT enriched diet
3.6 Discussion
3.7 Acknowledgments and financial support161
3.8 Disclosures
3.9 Figure legends
3.10 Figures
3.11 Tables
CHAPITRE IV CONCLUSION ET PERSPECTIVES
4.1 Conclusion
4.2 Perspectives
4.2.1 La thermogenèse hépatique : une cible prometteuse
4.2.2 Exploration plus élargie des effets bioactifs des MCFA médiés par
GPR40/FFAR1 et GPR84
4.2.3 Les effets possibles des MCT sur l'activité physique213
4.3 Synthèse des perspectives
ANNEXE A le remodelage de la flore intestinale par les triglycerides à chaines
moyennes comme possible strategie d'amelioration de la sante metabolique
ANNEXE B la contribution de la lipogenese de novo hepatique dans la progression
de la steatose hepatique non alcollique
DÉEÉDENCES 279
REFERENCES
BIBLIOGRAPHIE

xii

LISTE DES FIGURES

Figure		Page
1.1	Les composantes de la TDEE et leurs contributions à la TDEE	03
1.2	Captation et actions signalétiques des acides gras libres au sein de cellules mammaliennes	08
1.3	La voie anabolique de la lipogenèse de novo (DNL) et sa régulation	16
1.4	Synthèse des triglycérides et des gouttelettes lipidiques selon le modèle standard du bourgeonnement	18
1.5	Le transport des lipoprotéines chez l'humain	24
1.6	Déroulement et régulation de la lipolyse	29
1.7	Estimation de l'énergie chimique utile libérée après l'oxydation complète de l'acide palmitique	31
1.8	Transfert de l'acétyl-CoA du cytosol vers la mitochondrie par le système CPT	32
1.9	Transfert mitochondrial de l'acyl-CoA puis déroulement de la voie mitochondriale de la β-oxydation	35
1.10	Interconnexion des principales voies d'oxydation des lipides	39
1.11	Récapitulatif des trois voies de l'autophagie	41
1.12	Dégradation des gouttelettes lipidiques par lipophagie	43
1.13	Mécanisme de la synthèse d'ATP par phosphorylation oxydative mitochondriale	46

1.14	Voies cataboliques privilégiées selon les tissus chez les mammifères	48
1.15	La thermogenèse par l'action d'une protéine découplante mitochondriale.	50
1.16	Mécanismes d'action des protéines UCP selon les modèles de « rotation des acides gras » et de « la navette acides gras »	52
1.17	Activation de la thermogenèse par les catécholamines et le peptide natriurétique	57
1.18	Différentiation des adipocytes bruns et des adipocytes beiges	60
1.19	Le rôle central l'AMPK dans la régulation du métabolisme cellulaire	64
1.20	Le rôle central de l'AMPK hypothalamique dans la régulation de la balance énergétique de l'organisme	66
1.21	Régulation de l'activité transcriptionnelle des PPARs	68
1.22	Répartition des différents types de tissu adipeux chez les rongeurs et les humains	74
1.23	Hyperplasie et hypertrophie, deux modes distincts d'expansion adipeuse avec des conséquences diamétralement opposées	77
1.24	Schématisation de la progression de la NAFLD	80
1.25	Schématisation du modèle du multi-hit causant la NAFLD	85
1.26	Mécanismes de la lipoapoptose	89
2.1	Effect of fatty acids on HepG2 cell viability and mitochondrial membrane potential	129
2.2	Effect of fatty acids on HepG2 intracellular lipid storage	130
2.3	Effect of fatty acids on HepG2 lipid anabolism	131

2.4	Effect of fatty acids on HepG2 lipid β-oxidation activity	132
2.5	Effect of fatty acids on insulin-induced glucose uptake by HepG2 cells	133
2.6	Effect of fatty acids on the insulin-induced signaling cascade in HepG2 cells	134
3.1	High-fat diets enriched in MCT do not adversely affect body weigh nor insulin sensitivity	168
3.2	A high-fat diet rich in MCT improves markers of hepatic health	169
3.3	A high-fat diet rich in MCT triggers the overexpression of key markers of thermogenesis in liver	170
3.4	A high-fat diet rich in MCT exert beneficial effects on visceral white adipose tissue	171
3.5	A high-fat diet enriched in MCT exert beneficial effects on subcutaneous white adipose tissu	172
3.6	Body weight and insulin resistance are reduced in metabolically unhealthy obese mice fed a high-fat diet enriched in MCT	173
3.7	A high-fat diet enriched in MCT improves steatosis modulating hepatic lipid catabolism in obese animals	174
3.8	Expression of thermogenesis markers are increased in subcutaneous WAT of obese mice on a MCT enriched diet	175
4.1	Effets pléiotropes du facteur GLP-1	194
4.2	Vue d'ensemble des effets thermogènes et anorexigènes de l'agonisme du Glp-1-r murin dans les régions hypothalamiques VMH, ARC, PVH et LHA	196
4.3	Voies de sécrétion de GLP-1 induites par le glucose et les lipides	198

4.4	Procédures expérimentales devant aboutir à la caractérisation d'un éventuel axe MCFA-GPR40/FFAR1-incrétines potentialisant les fonctions pancréatiques de sécrétion d'insuline	201
4.5	Procédures expérimentales devant aboutir à la caractérisation d'un éventuel axe MCFA-GPR40/FFAR1-incrétines potentialisant les fonctions pancréatiques de sécrétion d'insuline	204
4.6	Impact des différentes diètes expérimentales sur l'inflammation au niveau hépatique	212
4.7	Relation inverse entre l'induction de l'obésité par une diète riche en gras, et l'activité physique, chez des souris de la souche C57BL6/J	215
4.8	Mesure de l'activité physique spontanée de souris C57BL/6 préalablement obèses, stéatosées et insulinorésitstantes, soumises 7 semaines à une LFD, une HFD, une diète M20 ou une diète M40	218
A.1.1	Crosstalk between gut, liver and peripheral metabolic tissues under 4 meta states	bolic 248
A.2.1	Schematic representation of pathological conditions spectrum characterizing the NAFLD progression	274
A.2.2	2 The lensing model of the lipid droplets biogenesis	(LD) 275
A.2.3	De novo lipogenesis pathway	276

LISTE DES TABLEAUX

Tableau		Page
1.1	Les principaux facteurs de transcriptions prolipogéniques, leurs domaines de liaisons, leurs gènes cibles, et leurs modes de régulations	20
2.1	Primary antibodies used for Western blots	136
2.2	Oligonucleotides used for quantitative RT-PCR analysis	136
3.1	Caloric breakdown and nutritional composition of diets	181
3.2	Primers sequences for mouse and human genes used in real-time PCR	182
3.3	Antibodies used for Western blots	182
A.1.1	Antiobesity effects of MCT and MCFA	250
A.1.2 Antimicrobial and gut-managing effects of MCT 25		

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ABCA1	ATP-binding cassette transporter ABCA1
ACACA	Acétyl-CoA carboxylase Alpha (gène)
ACBP	Acyl-CoA-binding protein
ACC1/2	Acétyl-CoA carboxylase 1/2 (protéine)
ACLY	ATP-citrate lyase
ACSL	long-chain acyl-CoA synthetase
АСТН	Adrenocorticotropic hormone
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADP	Adénosine diphosphate
ADRB3	Adrenergic receptor beta-3
AFLD	Alcoholic fatty liver disease
AGPAT	1-acylglycerol- 3 -phosphate- O -acyltransferase
AgRP	Agouti-related protein
AKT	Protéine kinase B
ALT	Alanine Aminotransférase
AMP	Adénosine monophosphate
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
АМРК	AMP-activated protein kinase
ANGPTL3/4/8	angiopoietin-like factors 3/4/8
AP-1	Activator protein 1
ApoB100&D	Apolipoprotéine B100&D
ARN	Acide ribonucléique
AST	Aspartate aminotransférase
ATF2	Activating transcription factor 2

ATGL	Adipose triglyceride lipase
ATP	Adénosine triphosphate
ATPase	ATP synthase
AUC	Area under curves
BAT	Brown adipose tissue
BAX	Bcl-2-associated X protein
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
BMDC	Bone marrow derived cells
BMP	bone morphogenic proteins
BSA	Bovine serum albumin
C/EBΡα/β/δ	CCAAT-enhancer-binding proteins $\alpha/\beta/\delta$
CACT	carnitine acylcarnitine translocase
СаМККβ	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase eta
CD36/68/163/206	Cluster of diffrentiation 36/68/163/206
CE	Cholesteryl ester
CETP	cholesteryl ester transport protein
CGI-58	co-activator comparative gene identification-58
ChoRE	carbohydrate response element
ChREBP	carbohydrate response element binding protein
СМА	Chaperon mediated autophagy
CoA	Coenzyme A
CPT1/2	carnitine palmitoyl transferase 1/2
CREB	cAMP response element-binding protein
CYP4A	Cytochrome P450 Family 4 Subfamily A Member A
DGAT	diacylglycerol acyltransferase
DHA	Acide docosahéxanoique
DIT	Diet-induced thermogenesis
DMEM	Dulbecco's modified Eagle medium

DMSO	diméthyl sulfoxyde
DNL	De novo lipogenesis
EGF	Epidermal growth factor
EGR1	Early growth response protein 1
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
ELOVL 1-7	Elongation of very long-chain fatty acids proteins 1-7
EM	Enzyme malique
EMEM	Eagle's Minimum Essential Medium
EPA	Acide eicosapentanoique
ERK1/2	Extracellular regulated kinase 1/2
F4/80	EGF-like module-containing mucin-like hormone receptor-like 1
FADH ₂	flavine adénine dinucleotide réduite
Fas	FS-7-associated surface antigen
FASN	Fatty acid synthase
FATP	Fatty acid transfer protein
FCCP	carbonyl cyanide p-(tri-fluromethoxy)phenyl-hydrazone
FFAR 1-5	Free fatty acid receptor 1-5
FGF21	Fibroblast growth factor 21
FNDC5	Fibronectin Type III Domain Containing 5 (gène)
FOXO1	Forkhead Box O1
GIP	Glucose-dependent insulinotropic polypeptide
GLP-1	Glucagon-like peptide 1
GLP-1-R	GLP-1-Receptor
GLUT2/4	Glucose transporter 2/4
GMP	Guanosine monophosphate
GMPc	Guanosine monophosphate cyclique
GPAT	glycérol-3-phosphate acyltranférase
GPCR (GPR) 40, 84, 119, 120	G-protein coupled receptor 40, 84, 119, 120

GSIS	Glucose-stimulated insulin secretion
GTPase	guanosine triphosphate hydrolase
GTT	Glocuse tolerance test
HDL	High density lipoprotein
HFD	High fat diet
HMG-CoA	3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA
HOMA-IR	homeostatic model assessment of insulin resistance
HRP	Horseradish peroxidase
HSL	Hormon sensitive lipase
IgG	Immunoglobuline de classe G
IKK	IKB kinase
IL-1β/6/8/10	Interleukine 1β/6/8/10
iMSNs	Indirect pathway medium spiny neurons
IP3	Inositol 1,4,5-trisphosphate
IR	Insulin receptor
IRS	Insulin receptor substrate
ITT	Insulin tolerance test
JNK	c-Jun N-terminal kinases
kcal	kilocalories
kDa	kilodalton
КО	Knock-out
LAL	Lipase acide lysosomale
LAMP-2A	Lysosomal associated membrane protein 2A
LC3-II	Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3-II
LCAD	long-chain acyl-CoA dehydrogenase
LCFA	Long-chain fatty acid
LCT	Long-chain triglycerides
LD	Lipid droplets

LDL	Low density lipoprotein
LDLR	LDL-receptor
LFD	Low fat diet
LKB1	Liver kinase 1
LPL	Lipase lipoprotéique
LPS	Lipopolysaccharide
LRP	LDL receptor-like proteins
LXR	Liver X receptor
LXRE	LXR response element
MAM	Mitochondria-associated membranes
МАРК	Mitogen-activated protein kinase
MCAD	Medium-chain acyl-CoA dehydrogenase
MCFA	Medium-chain fatty acids
МСТ	Medium-chain triglycerides
MGL	Monoglycerol lipase
МКАТ	Medium-chain 3-ketoacyl-CoA thiolase
mTOR	Mechanestic target of rapamycin
mTORC1	Mechanestic target of rapamycin complex 1
MTP	Mitochondrial trifunctional protein
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
Myf5	encoding myogenic factor 5-expressing
NAD+	nicotinamide adénine dinucléotide oxydée
NADH	nicotinamide adénine dinucléotide réduite
NAFLD	Non alcoholic fatty liver disease
NASH	Non alcoholic steatohepatitis
NF-ĶB	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NPY	Neuropeptide Y
NREE	Non-resting energy expenditure

xxii

p62	Ubiquitin-binding protein p62
p70s6K	Ribosomal protein S6 kinase B1
PAP	phosphatidic acid phosphohydrolase
PCR	Polymerase chain reaction
PDGF	Platelet-derived growth factor
PFK2	6-phosphofructo-2-kinase
PGC1a	$\label{eq:peroxisome} Peroxisome\ proliferator-activated\ receptor\ gamma\ coactivator\ l-\alpha$
Pi	groupement phosphate organique
PI3K	Phosphoinositide 3-kinases
PIP2	Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate
РК	Pyruvate kinase
PKA/C/G	Protéine kinase A/C/G
PLIN 2/3/5	Périlipines 2/3/5
	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator
PPARGC1A	1-alpha (gène)
ΡΡΑRα/δ/γ	Peroxisome proliferator-activated receptor $\alpha/\delta/\gamma$
PRDM16	PR/SET Domain 16
PRMT1	arginine méthyltransférase
PUFA	Polyinsaturated fatty acid
ROS	Reactive oxygen species
RXR	Retinoid X receptor
SCAD	Short-chain acyl-CoA dehydrogenase
SCD-1	Δ-9-Stearoyl-CoA desaturase 1
SCEH	short-chain 2,3-enoyl-CoA hydratase
SCFA	Short-chain fatty acid
SCHAD	Short-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase
SEM	Standard error of the mean
SGLT	Sodium-glucose linked transporter ou Na ⁺ -coupled glucose carrier

xxiii

SIRT1	Sirtuine 1
SKAT	Short-chain 3-ketoacyl-CoA thiolase
SNS	Système nerveux central
SRB1	Scavenger receptor B1
SRE	Sterol response element
SREBP-1c/2	Sterol regulatory element-binding protein-1C/2
Т3	Triiodothyronine
T4	Thyroxine
TAS	Tissu adipeux sous-cutabé
TAV	Tissu adipeux viscéral
TDEE	Total daily energy expenditure
TG	Triglycerides
TIC	Transport inverse du cholestérol
TLR2/4	Toll-like receptor 2/4
ΤΝΓα	Tumor necrosis factor alpha
TRAIL	Tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand
TSH	Thyroid stimulating hormone
UCP1-4	Ucoupling protein 1-4
ULK1	UNC-51-like kinase 1
UPR	Unfolded proteins responses
USF-1	Upstream stimulatory factor 1
VDAC1	Voltage-dependent anion-selective channel 1
VLCFA	Very long-chain fatty acids
VLDL	Very low density lipoproteins
VMH	Hypothalamic ventromedial nucleus
WAT	White adipose tissue
ZFP423	Zinc finger protein 423

LISTE DES SYMBOLES ET DES UNITÉS

%	POURCENTAGE
μ-, m-, L	MICRO-, MILI-, LITRE
μ-, m-, M	MICRO-, MILI-, MOLAIRE
μ-, m ²	MICRO-, MÈTRE CARRÉ
°C	DEGRÉ CELCIUS (OU DEGRÉS CENTIGRADES)
^{14}C	CARBONE 14
³ H	TRITIUM
h	HEURE
М	MOLARITÉ (MOLES/LITRE)
min	MINUTES
n	ÉCHANTILLON STATISTIQUE
n-, μ-, k-, g	NANO-, MICRO-, KILO-, GRAMME
n-, μ-, m-, m	NANO-, MICRO-, MILI-, MÈTRE
pН	POTENTIEL HYDROGÈNE (ACIDITÉ)
S	SECONDES
V	VOLUME
w	WEIGHT (POIDS)
ψ	POTENTIEL DE MEMBRANE CELLULAIRE

RÉSUMÉ

Le siècle dernier et l'actuel furent marqués d'une grande victoire de l'Humanité dont les exploits médicaux ont su faire reculer, voire venir à bout de la plupart des maladies infectieuses autrefois meurtrières. Aujourd'hui, l'Humanité est confrontée à un nouveau défi sanitaire, celui de faire reculer les maladies chroniques. Parmi ces dernières, l'obésité et le surpoids, avec des prévalences mondiales galopantes et affectant près du tiers des humains, sont deux préoccupations mondiales de santé publique.

L'obésité, de même que le surpoids qui n'est rien d'autre que le stade précoce de l'obésité, sont définis comme une accumulation excessive de réserves lipidiques dans le tissu adipeux. Alors que dans certains cas, une telle accumulation peut être sans conséquences majeures sur la santé, elle représente dans bien d'autres cas une véritable menace pour la santé du patient. Ainsi, une majorité d'individus obèses sont à risque de développer des comorbidités comme le syndrome métabolique, des maladies cardiovasculaires, le diabète de type 2 et la stéatose hépatique non alcoolique. D'ailleurs, la NAFLD est aussi une source de préoccupation majeure de par sa prévalence également estimée à près d'un tiers de la population et des risques auxquels elle prédispose, comme la résistance à l'insuline, la stéatohépatite, et la fibrose ainsi que la cirrhose hépatiques. La NAFLD, connue du grand public comme la maladie du foie gras, résulte d'une accumulation ectopique des triglycérides dans le foie. Or, l'accumulation ectopique des lipides, c'est-à-dire leur accumulation en excès dans des organes qui sont sensés ne stocker que de légères (voire de négligeables) quantités de lipides (comme le foie, les muscles squelettiques, le cœur et le pancréas), provoque des mécanismes de lipotoxicité défavorables à l'intégrité et au bon fonctionnement de ces organes. Lorsque l'obésité entraine une saturation des capacités de stockage du tissu adipeux sous cutané, l'excès de calories s'accumule dans le tissu adipeux viscéral et promeut l'obésité abdominale et le stockage ectopique des lipides. Ce phénotype favorise à son tour la lipotoxicté, la résistance à l'insuline périphérique et tissulaire, ainsi que l'inflammation chronique systémique et tissulaire. Tous ces mécanismes délétères sont sous-jacents aux complications de l'obésité et à ses comorbidités.

La généralisation d'une diète trop riche en glucides et en lipides, et un style de vie qui favorise la sédentarité, sont, en plus de déterminants génétiques, épigénétiques et métagénomiques divers, des composantes majeures de l'étiologie de l'obésité et de la NAFLD. En effet, un haut apport énergétique insuffisamment compensé par la dépense énergétique, entrainent un bilan énergétique positif qui stimule les voies anaboliques de la lipogenèse *de novo* (DNL), puis du stockage des acides gras et des triglycérides.

Les travaux de cette thèse ont permis de mieux caractériser le potentiel préventif et curatif des lipides à chaînes moyennes contre l'accumulation délétère des lipides. Dans un premier temps, nous avons démontré que les acides gras à chaînes moyennes (MCFA), contrairement aux acides gras à chaînes longues (LCFA), n'induisent pas de lipotoxicité, n'entrainent pas d'accumulation excessive de triglycérides et ne provoquent pas de résistance à l'insuline dans des hépatocytes de la lignée HepG2 en cultures. De plus, les MCFA tendent même à accroître l'oxydation des lipides et à potentialiser la réponse de la voie AKT-mTOR à l'insuline, dans les hépatocytes.

Dans un deuxième temps, nous avons donc étudié l'hypothèse selon laquelle une diète grasse (45% des kcal issus de lipides) enrichie graduellement en triglycérides à chaînes moyennes (MCT) plutôt qu'en triglycérides à chaînes longues (LCT), pouvait ralentir voire réduire l'obésité et la stéatose hépatique, chez des souris. Chez les souris non obèses, nous avons observé que les diètes grasses avec des ratios croissants de MCT/LCT réduisaient d'une manière dose-dépendante la prise de masse corporelle, l'hypertrophie des adipocytes blancs sous-cutanés et viscéraux, la résistance à l'insuline, et la stéatose hépatique. D'une manière intéressante, le ratio MCT/LCT maximal a entrainé une hausse significative des marqueurs clefs de la thermogenèse, au niveau hépatique seulement, de même qu'une diminution de la masse corporelle, de la masse adipeuse et des niveaux de triglycérides hépatiques en dessous des niveaux mesurés chez les contrôles nourris avec une diète faible en gras (LFD). In vitro, nous avons démontré que la stimulation de l'expression du gène thermogène UCP1 dans les hépatocytes par les MCFA dépendait de l'activation du récepteur GPR40/FFAR1. Chez des souris obèses et insulinorésistantes, le remplacement partiel des LCT par des MCT n'a pas eu d'effet significatif, mais la diète grasse avec le ratio MCT/LCT maximal a entrainé des réductions significatives de la masse corporelle, de la stéatose hépatique et de la résistance à l'insuline. Chez les souris obèses, cette diète s'est traduite, dans le même temps, par une hausse de l'expression des marqueurs de la thermogenèse Ppargcla et Ucpl aussi bien dans le foie que dans le tissu adipeux sous-cutané.

Les résultats de cette thèse démontrent que les lipides à chaînes moyennes préservent la santé métabolique, d'une part en évitant les voies anaboliques de stockage des lipides, d'autre part en induisant, via leur fonction bioactive, des processus cataboliques. Autrement dit, les lipides à chaînes moyennes induisent une balance énergétique favorable au catabolisme, contrairement aux lipides à chaînes longues, favorisant la réduction des réserves lipidiques adipeuses et hépatiques. En conclusion, nos résultats suggèrent que le remplacement partiel ou maximal des lipides délétères de la diète contemporaine, par les lipides à chaînes moyennes, représenterait une stratégie nutritionnelle prometteuse pour contribuer au recul de l'obésité et de la NAFLD.

Mots clés : Obésité, NAFLD, résistance à l'insuline, lipotoxicité, DNL, lipides à chaînes moyennes, oxydation des lipides, thermogenèse, UCP1, AMP, GPR40/FFAR1

CHAPITRE I ETAT DES CONNAISSANCES

1.1 Introduction

L'obésité est une maladie métabolique complexe, multifactorielle et associée à plusieurs comorbidités comme le syndrome métabolique, la stéatose hépatique non alcoolique (NAFLD), la résistance à l'insuline et le diabète de type 2. Cette maladie contemporaine est un facteur contributeur important aux maladies cardiovasculaires, aux accidents vasculaires cérébraux, et même à certains types de cancer (Oussaada et al., 2019; Smith & Smith, 2016a). L'obésité est la cause directe ou indirecte de près de 3,4 millions de décès annuellement, ce qui en fait une préoccupation majeure de santé publique à travers le monde. La population totale d'humains en surpoids ou obèses est estimée à 2,1 milliards d'individus. Chez les adultes africains, caucasiens, afroaméricains, hispaniques et américains blancs, les communautés les plus représentées ici en Amérique du nord, le surpoids est diagnostiqué pour un indice de masse corporelle (IMC) compris entre 25 et 29,2 kg/m², et les différentes classes d'obésité correspondent à des IMC supérieurs à 30 kg/m² et parfois même supérieurs à 40 kg/m² (Smith & Smith, 2016a). Pour les adultes de l'Asie et de l'Asie du sud-est, le surpoids est généralement diagnostiqué pour des IMC compris entre 23 et 24,9 kg/m², et l'obésité pour des IMC dépassant 25 kg/m² (Smith & Smith, 2016a). Au Canada, la prévalence de l'obésité chez les adultes a bondi de 6,1% à 18,3% entre 1985 et 2011 (Twells et al., 2014).

Au niveau de l'organisme, l'obésité se traduit par un stockage excessif de graisses corporelles dans les différents compartiments du tissu adipeux blanc. L'obésité devient délétère pour la santé métabolique lorsque ce stockage excessif implique l'expansion du tissu adipeux viscéral et l'accumulation ectopique des lipides dans des tissus non adipeux comme le foie, les muscles et le pancréas (Despres & Lemieux, 2006; Engin,

2017b; Tchernof & Després, 2013). Les tissus concernés par l'accumulation ectopique des lipides subissent potentiellement des dommages majeurs qui définissent la pathophysiologie de la NAFLD, de la résistance à l'insuline, du diabète de type 2 et de l'altération des fonctions musculaires. L'obésité est la conséquence d'un déséquilibre chronique entre l'anabolisme et le catabolisme des glucides et des lipides, du fait d'un apport élevé en nutriments à haute teneur calorique et d'une réduction de la dépense énergétique. Il s'agit donc de la conséquence d'un débalancement énergétique soutenu. De manière quantifiable, la balance énergétique est déterminée par la modulation de l'énergie quotidienne ingérée (la teneur calorique des aliments consommés en une journée) et de la dépense énergétique totale quotidienne (TDEE, pour total daily energy expenditure) dont les composantes sont représentées en figure 1.1 (Ho, 2018; Trexler et al., 2014; von Loeffelholz & Birkenfeld, 2000). La TDEE inclut la dépense énergétique au repos (ou de base, ou REE pour resting energy expenditure) et la dépense énergétique hors repos (NREE, pour non-resting energy expenditure). La REE est la somme de l'énergie métabolique basale (BMR, pour basal metabolique rate), l'énergie que mobilise l'organisme pour accomplir l'ensemble de ses processus vitaux, et de la thermogenèse postprandiale (DIT, pour *diet-induced thermogenesis* ou TEF, pour thermic effect of food). Quant à la NREE, elle est la somme de la thermogenèse résultant de l'activité physique (AEE, pour exercice-related EE) et de la thermogenèse indépendante de l'activité physique volontaire, comme celle associée au tonus musculaire ou encore au fait de « gigoter » (NEAT, pour non-exercice related EE). Certains auteurs (voir la figure 1.1) considèrent la TEF comme une composante de la NREE (Trexler *et al.*, 2014). Selon la première loi de la thermodynamique, l'énergie ne peut ni être détruite ni disparaitre. Autrement dit, toute énergie calorique assimilée qui n'est pas dépensée par les processus du TDEE est forcément stockée en énergie chimique potentielle, sous la forme de glycogène dans une moindre mesure, mais aussi et surtout sous forme de graisses au terme des différentes voies de l'anabolisme des lipides.



Figure 1.1 : Les composantes de la TDEE et leurs contributions à la TDEE. BMR (basal metabolic rate) ; NEAT (non-exercise activity thermogenesis) ; TEF (thermic effect of food) ; EAT (exercise activity thermogenesis) ; REE (resting energy expenditure) ; NREE (non-resting energy expenditure) ; TDEE (total daily energy expenditure). (Trexler et al., 2014).

Il a longtemps été considéré que les individus obèses avaient une dépense énergétique inférieure à celle des individus non obèses. Cette interprétation (qui, du reste, n'est pas définitivement écartée) suggérait qu'un déficit dans une des composantes du TDEE (pour des causes comportementales, environnementales, génétiques, ou épigénétiques), associé à un apport calorique trop élevé, provoque une balance énergétique positive propice au développement de l'obésité (Carneiro *et al.*, 2016). Des analyses récentes ont critiqué ce modèle en démontrant que le TDEE, lorsque relativisé à la masse maigre totale, n'était pas différent entre obèses et non obèses (Carneiro *et al.*, 2016), ce qui accentuerait la responsabilité des diètes caloriques dans le débalancement anabolique. Enfin, certaines observations pointent la contribution d'un déficit de la DIT et de la NREE, spécifiquement dus à la faible activité physique et la forte consommation de

gras, dans l'instauration d'une balance énergétique positive obésogène (Carneiro *et al.*, 2016; Trexler *et al.*, 2014).

Les lipides à chaînes moyennes constituent une classe de lipides alimentaires dont la consommation est officiellement reconnue pour son innocuité. Au sein des huiles qui les renferment (comme les huiles commerciales de type MCT-oil) les lipides à chaînes moyennes se retrouvent essentiellement sous leur forme estérifiée triglycérique. On parle alors de triglycérides à chaînes moyennes (MCT, pour medium-chain triglycerides). Lorsque les MCT sont hydrolysés, comme n'importe quel triglycéride, comme par exemple durant la digestion intestinale, les acides gras libérés sont lesdits acides gras à chaînes moyennes (MCFA, pour medium-chain fatty acids). L'expression « lipides à chaînes moyennes » est donc un terme générique qui englobe les MCT et les MCFA. Contrairement aux lipides à chaînes longues qui sont retrouvés en abondance dans la plupart des aliments gras de la diète contemporaine, les lipides à chaînes moyennes sont connus pour leur haute propension à l'oxydation et pour accroître la dépense énergétique totale (TEE) (via plusieurs mécanismes qui seront mentionnés dans les chapitres qui suivent) chez les animaux comme chez les humains. Au vu de leurs caractéristiques, les lipides à chaînes moyennes ont, comparés aux lipides à chaînes longues, tendance à préserver une balance métabolique propre à éviter le stockage excessif des graisses par l'organisme (Rial et al., 2016b). La présente vise à mieux caractériser le potentiel antiobésogène et antistéatogène des lipides à chaînes moyennes en étudiant les mécanismes via lesquels ils favorisent une balance et une santé métabolique optimales.

1.2 Aperçu général des lipides et de leurs fonctions

1.2.1 Les lipides : définitions et fonctions générales

Les lipides sont définis comme des petites molécules organiques solubles dans des solvants organiques comme le chloroforme, les éthers ou l'alcool, et généralement insolubles dans l'eau (Li-Beisson *et al.*, 2016). Cette définition, qui n'est pas la seule

admise et qui est parfois soumise à des contre-exemples (le cas des lipides à chaînes moyennes, cœur de cette thèse, en est un par excellence), inclut une large gamme de composés, comme les acides gras libres, les glycérolipides, les phosphoglycérides, les sphingolipides, les squalènes, le cholestérol et ses dérivés, et les eicosanoïdes dérivés des acides gras polyinsaturés. Faisant partie, avec les acides aminés, les glucides et les nucléotides, des molécules fondamentales du vivant, les lipides jouent plusieurs rôles biologiques essentiels. Chez l'animal, ils ont d'abord un rôle de structure. Les lipides, et plus particulièrement les phosphoglycérides (qui incluent toutes les classes de phospholipides), les sphingolipides et le cholestérol, représentent jusqu'à 70% de la masse des membranes cellulaires (Li-Beisson et al., 2016) et des gaines de myéline entourant les axones neuronaux du système nerveux (Ozgen et al., 2016). Les lipides entrent abondamment dans la composition de nombreux biomatériaux de revêtements tensioactifs comme les surfactants alvéolaires sécrétés par les pneumocytes de type 2 (Fehrenbach, 2001) ou de barrière comme le sébum sécrété par les glandes sébacées (Picardo et al., 2009). En outre, les lipides et leurs métabolites participent activement aux fonctions du système endocrinien. En effet, les hormones stéroïdes dérivées du cholestérol, de même que les eicosanoïdes qui englobent les célèbres leucotriènes et prostanoïdes, sont capables d'activer de nombreuses voies signalétiques et métaboliques, régulant, parmi une multitude d'autres processus physiologiques, la morphogenèse (Haldar et al., 2003), le développement (Kawata, 1995), le cycle reproducteur, les processus inflammatoires (Umamaheswaran et al., 2018), l'activité plaquettaire et la contraction des muscles lisses (Narumiya et al., 1999). Enfin, les lipides constituent une fabuleuse source d'énergie chimique pour l'organisme, comme il le sera expliqué dans ce qui suit. Renfermant une forte teneur en énergie chimique potentielle, les lipides, et plus particulièrement les acides gras, permettent de régénérer efficacement de l'ATP et de la chaleur lorsqu'oxydés, comme ils peuvent, au contraire, renflouer les réserves énergétiques lorsqu'ils sont estérifiés puis stockés sous forme de triglycérides et de diglycérides dans les réserves adipeuses de l'organisme et les compartiments lipidiques des cellules métaboliques.

1.2.2 Une définition du métabolisme des lipides

Le métabolisme des lipides est défini comme l'ensemble des réactions biochimiques se déroulant, chez l'Homme ou chez l'animal, pour assimiler les lipides de la diète ou en synthétiser de manière endogène, en vue de leur conférer leurs innombrables fonctions structurales, endocriniennes, signalétiques ou énergétiques (Baenke et al., 2013). Dans des conditions optimales, le métabolisme des lipides est gouverné par une régulation fine des voies anaboliques et des voies cataboliques des lipides. L'anabolisme des lipides comprend tous les processus qui permettent aux cellules (et donc à l'organisme) de s'approvisionner en lipides en assimilant ceux qui sont fournis par la diète et en en synthétisant de novo pour les mettre en réserves, les utiliser comme éléments de structures, et les échanger entre tissus. Quant au catabolisme des lipides, il comprend les voies lipolytiques de désestérification des acides gras, et les différentes voies d'oxydation des acides gras en vue d'en libérer de l'énergie chimique utile cinétique ou thermique. Comme nous le verrons plus bas, des contextes environnementaux et comportementaux (qui prévalent hélas de plus en plus de nos jours) qui favorisent un débalancement du métabolisme des lipides en faveur de l'anabolisme, sont les causes principales des maladies métaboliques d'accumulation des lipides, à l'instar de l'obésité et de la stéatose hépatique non alcoolique.

1.3 L'anabolisme des lipides

1.3.1 La captation des acides gras

1.3.1.1 La captation des acides gras au niveau cellulaire

Les cellules ont la capacité de s'approvisionner en lipides non endogènes en captant puis en internalisant les acides gras libres pour les séquestrer sous forme d'acyl-CoA, tel qu'illustré en figure 1.2 (Calderon-Dominguez *et al.*, 2016; Gimeno, 2007; Mashek *et al.*, 2007; Tarhda & Ibrahimi, 2015). Ces acides gras libres se retrouvent sous forme émulsifiée dans les lumières intestinales lors de la digestion, sont véhiculés à travers la

circulation sanguine par l'albumine sérique, ou peuvent être issus de l'hydrolyse, catalysée par l'enzyme de surface lipoprotéine lipase (LPL), des triglycérides qui composent les lipoprotéines circulantes comme les chylomicrons. Les acides gras libres sont internalisés par les cellules par diffusion simple à une moindre échelle mais surtout par diffusion facilitée au moyen de différents transporteurs membranaires. Ces transporteurs sont certes ubiquitaires, mais ce sont les cellules dites « métaboliques » comme les entérocytes, les hépatocytes, les adipocytes et les myocytes qui les arborent le plus abondamment (Kazantzis & Stahl, 2012). Les principaux de ces transporteurs sont le *cluster of differentiation 36* (CD36) et les neuf protéines de la famille des *Fatty* acids transport proteins (FATP1-9), toutes exprimées à la surface de différents types cellulaires selon les isoformes. D'après de récents modèles (Calderon-Dominguez et al., 2016; Gimeno, 2007; Tarhda & Ibrahimi, 2015), ces transporteurs partageraient le même mécanisme d'action en séquestrant dans leurs domaines hydrophobes les queues aliphatiques des acides gras à longues et à très longues chaînes, avant de les libérer dans le milieu intracellulaire à la suite d'un changement conformationnel. D'autres modèles suggèrent plutôt un rôle complémentaire entre CD36 et les FATP (Doege & Stahl, 2006; Son et al., 2018) ; plus exactement, CD36 se limiterait à lier les acides gras à proximité de la face externe de la membrane plasmique pour ensuite provoquer leur interaction avec la FATP chargée de leur internalisation proprement dite. En outre, les protéines FATP, du fait de leur seconde activité de type acyl-CoA-synthase, convertissent en acyl-CoA les acides gras qu'elles transloquent. Une autre enzyme membranaire, la long-chain acyl-CoA synthetase (ACSL), convertit les acides gras en acyl-CoA (Mashek et al., 2007). Ces derniers sont des lipides dits « activés » pour la simple raison que les acides gras doivent être convertis en acyl-CoA pour pouvoir être guidés par l'acyl-CoA binding protein (ACBP) vers leurs différentes voies métaboliques (Mashek et al., 2007). La transformation en acyl-CoA permet en outre d'augmenter la solubilité des acides gras dans le cytosol. De plus, sous leur forme acyl-CoA, les lipides sont séquestrés au sein de la cellule. Quant aux MCFA et aux acides gras à courtes chaînes, leur polarité relativement faible leur permet d'être transportés

essentiellement par diffusion simple à travers les membranes, sans l'intervention de protéines de transport (Schönfeld & Wojtczak, 2016).

En outre, les acides gras de toutes les tailles ont la capacité de se lier à une grande variété de récepteurs membranaires de types *G-protein coupled receptor* (GPCR) et *Toll-like receptors* (TLR). Ces récepteurs ont des fonctions de signalisation fabuleusement diversifiées (régulation de l'inflammation, de la sécrétion des hormones, de la motilité intestinale, de l'imperméabilité de la barrière intestinale, du métabolisme des lipides, du comportement, etc.) (Hwang *et al.*, 2016; Priyadarshini *et al.*, 2018; Pujol *et al.*, 2018; Tomita *et al.*, 2014) mais ne participent pas (du moins ce n'est pas leur fonction primaire) au transport de leurs ligands lipidiques.



Figure 1.2 : Captation et actions signalitiques des acides gras libres au sein de cellules mammaliennes. (A) Les acides gras issus de l'hydrolyse des triglycérides
lipoprotéiques par la LPL lient, à la surface cellulaire, des protéines de signalisation (exemple TLR et GPR40) ou les protéines de transport FATP et CD36. Les voies de signalisation induites régulent les processus de l'inflammation, de l'immunité (par les cellules lymphoïdes et les cellules métaboliques), de la sécrétion de l'insuline (par les cellules- β du pancréas) et inhibent la libération des peptides orexigènes AgRP et NPY (au niveau de l'hypothalamus). Quant au transport, il est représenté selon le paradigme d'un rôle complémentaire entre CD36 et FATP. Après leur captation, les acides gras non-acylés et les acides gras acylés par ACSL sont respectivement liés par FABP et ACBP en vue de la coactivation de récepteurs nucléaires régulant l'expression de gènes métaboliques (voir la section 1.6.2 de l'état des connaissances consacrée aux PPARs), où sont mobilisées pour les voies oxydatives, la synthèse des triglycérides où les modifications postraductionnelles de protéines. (B) Illustration de quatre modèles différents proposant le mode d'action des FATP (1, simples transporteurs d'acides gras libres ; 2, molécules de membranes acylant les acides gras libres intracellulaires après leur diffusion passive ; 3, protéines bifonctionnelles de transport puis d'acylation des acides gras libres ; 4, ou protéines multifonctionnelles transportant et/ou acylant différents acides gras à la fois) TLR (Toll-like receptor); LPL (lipoprotein lipase); ACSL (long-chain acyl-CoA synthetase); FA (fatty acid); FFA (free fatty acid); FATP (fatty acids transport proteins); CoA (coenzyme A); ACBP (acyl-CoA binding protein) ; FABP (fatty acid binding protein); CD36 (cluster of differentiation 36); AgRP (Agouti-related peptide); NPY (neuropeptide Y); GPR40 (G-protein coupled receptor 40); TG (triglycérides). (Doege & Stahl, 2006).

1.3.1.2 La captation des lipides alimentaires au niveau intestinal

La plupart des lipides alimentaires se présentent sous forme de TG (triglycérides) et d'esters de cholestérol (EC). Lors de la digestion, ces lipides alimentaires subissent une micellisation sous l'action émulsifiante des stérols biliaires, puis sont hydrolysés, dans l'iléum, sous l'action des lipases pancréatiques (Charlton-Menys & Durrington, 2008; Gagné *et al.*, 2007; Hu *et al.*, 2010; Soffientini & Graham, 2016). Dans la lumière iléale, les acides gras et le cholestérol libres ainsi obtenus sont internalisés par les entérocytes. Plus exactement, le cholestérol est internalisé par les entérocytes sous l'action du transporteur spécifique NPC1L1 (*Niemann-Pick C1 Like1*) (Charlton-Menys & Durrington, 2008; Gagné *et al.*, 2007; Hu *et al.*, 2010; Soffientini & Graham, 2016), tandis que les phytostérols (stérols végétaux) sont pour la plupart aussitôt exocytés via le transporteur ABCG5/8 (*ATP binding cassette transporter G5 and G8*). Le

cholestérol libre cytosolique est transféré vers le réticulum endoplasmique sous l'action de l'enzyme MTP (*microsomal transfer protein*) dite aussi MTTP (*microsomal triglyceride transfer protein*) (Charlton-Menys & Durrington, 2008; Gagné *et al.*, 2007; Hu *et al.*, 2010; Soffientini & Graham, 2016). Le cholestérol est alors estérifié par une réaction d'acylation, dirigée sur son groupe hydroxyle, et catalysée par l'enzyme ACAT2 (Acyl-CoA cholestérol acyltransferase 2). L'ester de cholestérol ainsi généré est alors recruté, de mêmes que les acides gras estérifiés, pour participer à la composition et à la formation des chylomicrons.

Quant aux acides gras à chaines longues, ils sont internalisés par les entérocytes au moyen des transporteurs FATP4, CD36 et FABP (Wang *et al.*, 2013). Ils sont alors immédiatement activés sous par l'action de l'ACS1 pour former des acyl-CoA. Ces deniers servent de substrat à la voie de synthèse des triglycérides qui sera décrite dans le paragraphe 1.3.3.5. Comme les esters de cholestérol, les triglycérides néoformés au sein des entérocytes participent, grâce aux actions combinées de l'ApoB48 et de la MTTP, à structurer les chylomicrons. Ces derniers sont les transporteurs lipoprotéiques hydrosolubles qui permettent d'acheminer les lipides estérifiés depuis l'intestin vers le foie, via le système porte hépatique, une fois sécrétés par les entérocytes (Charlton-Menys & Durrington, 2008; Gagné *et al.*, 2007; Hu *et al.*, 2010; Soffientini & Graham, 2016).

1.3.2 La régulation de la captation des acides gras

Le flux de la captation des acides gras repose sur la régulation aux niveaux transcriptionnel et post-transcriptionnel des gènes codant pour les protéines LPL, CD36 et FATP. Ce sont essentiellement les hormones et les nutriments qui assurent cette régulation (Goldberg *et al.*, 2009; Niculite *et al.*, 2019; Smith *et al.*, 2008).

1.3.2.1 La régulation de la LPL

La régulation de l'enzyme LPL varie d'un tissu à l'autre. Chez l'adulte, l'activité hépatique de l'enzyme est absente du fait de mécanismes toujours mal définis (Camps *et al.*, 1991; Goldberg *et al.*, 2009). Par contre, la LPL est surtout active au niveau des muscles squelettiques, des macrophages, des cellules- β du pancréas, des glandes mammaires et du tissu adipeux (Goldberg *et al.*, 2009). L'insuline en est la principale hormone régulatrice. Au niveau des adipocytes mâtures (unités fonctionnelles du tissu adipeux), l'insuline augmente le rendement de la LDL en activant son expression génique aux niveaux post- transcriptionnels et post-traductionnels (Semenkovich *et al.*, 1989). Cependant, au niveau des muscles squelettiques au repos ou après exercice, l'insuline réduit l'activité de la LPL et privilégie plutôt la captation du glucose. Cela a été démontré par une ancienne étude d'association (Kiens *et al.*, 1989) et les mécanismes sous-jacents ne sont pas connus.

Sécrétés en réponse au froid et au jeûne par les adipocytes blancs et les hépatocytes, les facteurs *angiopoietin-like* 3, 4 et 8 (ANGPTL 3,4 et 8), et en particulier ANGPTL4 qui a été le mieux étudié, agissent de manière autocrine en inhibant la LPL (Dijk & Kersten, 2016; Koliwad *et al.*, 2012). Cela aurait pour finalité de favoriser la disponibilité des lipoprotéines circulantes pour les muscles et le tissu adipeux brun dans ces conditions de stress énergétique (Dijk & Kersten, 2016; Koliwad *et al.*, 2012). Le modèle mécanistique le plus récent, mis en évidence sur des adipocytes, suggère que ces facteurs interagissent directement avec la LPL intracellulaire au cours de sa synthèse, puis la clivent en monomères susceptibles d'être dégradés par l'endoprotéase *proprotein convertase subtilisin/kexin 3* (PCSK3), préalablement à une ultime étape de digestion lysosomale (Dijk *et al.*, 2018). Cela aboutirait à une diminution de la translocation de la LPL vers la membrane cellulaire.

En outre, pour sa translocation membranaire puis son activité catalytique optimale, la LPL doit subir deux modifications post-traductionnelles impliquant des glucides, soit la glycosylation et la mannolysation (Masuno *et al.*, 1991; Okamoto *et al.*, 2017).

D'ailleurs le glucose, sans doute pour cette raison, potentialise l'effet stimulant de l'insuline sur l'activité de la LPL (Goldberg *et al.*, 2009), ce qui est logique considérant qu'une hausse post-prandiale de la lipémie est en général associée à une hausse de la glycémie et de l'insulinémie (Hiyoshi *et al.*, 2017). Sur des sujets humains, il a été confirmé que la consommation soutenue (sur 15 jours) d'une diète riche en carbohydrates rehausse le niveau d'induction post-prandiale de l'activité des LPL adipeuses et musculaires (Yost *et al.*, 1998).

1.3.2.2 La régulation de CD36

La protéine CD36 est surtout exprimée par les hépatocytes, les adipocytes, les macrophages, les myocytes et les entérocytes (Goldberg *et al.*, 2009; Niculite *et al.*, 2019), ayant tous un rôle plus ou moins déterminant dans le métabolisme des lipides. Plusieurs facteurs de transcription induisent l'expression de CD36. Les plus importants, qui sont d'ailleurs des marqueurs clefs de l'adipogenèse (la maturation des adipocytes) (Madsen *et al.*, 2014), sont les *peroxisome proliferator-activated receptor* γ et δ (PPAR γ/δ), le *liver X receptor* (LXR), les *CCAAT/enhancer-binding proteins* (C/EBP), ainsi que l'*activating transcription factor 2* (ATF2) (Goldberg *et al.*, 2009; Lefterova *et al.*, 2008; Niculite *et al.*, 2019).

L'expression de CD36 est aussi régulée au niveau post-traductionnel par plusieurs mécanismes. D'une part, il a été démontré que la surexpression du facteur de transcription *Forkhead box protein O1* (FOXO1) induit une translocation accrue de CD36 vers la membrane cellulaire, augmentant ainsi la captation des acides gras par les myocytes (Bastie *et al.*, 2005). Par ailleurs, la contraction musculaire, de même que l'insuline et la condition de jeûne favorisent également la translocation membranaire de CD36 (Berlanga *et al.*, 2014b). En parallèle, l'insuline réduit l'ubiquitination (et donc limite la dégradation protéasomale) de CD36, via un mécanisme encore inconnu (Luiken *et al.*, 2016; Smith *et al.*, 2008). renforçant la captation des acides gras par ce biais également. Les acides gras libres (administrés sans insuline), en revanche, augmentent l'ubiquitination de CD36. Toutefois, l'effet de l'insuline domine l'effet des

acides gras libres sur l'ubiquitination de CD36 (Smith *et al.*, 2008). Ceci est en adéquation avec un contexte physiologique postprandial réputé favorable à la captation des acides gras, et où l'insulinémie comme la lipémie sont rehaussées.

1.3.3 La lipogenèse *de novo* (DNL)

1.3.3.1 Définition générale de la DNL

La voie de la lipogenèse de novo (DNL) permet la biosynthèse endogène des acides gras. Les étapes et la régulation de la DNL sont représentées dans la figure 1.3. Cette voie anabolique consiste, pour l'essentiel, à convertir en lipides les carbohydrates assimilés au-delà des besoins énergétiques immédiats de l'organisme ou lorsque les réserves de glycogène hépatique sont à pleine capacité. Plus exactement, La DNL permet, dans un premier temps, la transformation endergonique de simples molécules d'acétyl-CoA en acides gras saturés à chaînes longues. La DNL permet, dans le même temps, la transformation directe des acides gras endogènes ou issus de la diète, comme l'acide linoléique (C18:2), l'acide stéarique (C18:0), l'acide oléique (C18:1n-9), le palmitate (C16:0) ou le palmitoléate (C16:1n-7), en une vaste gamme d'acides gras à très longues chaînes (de 22 à 28 atomes de carbone de long) saturés, monoinsaturés ou polyinsaturés (Kihara, 2012). Le principal siège de la DNL, chez l'Homme – et chez d'autres animaux comme les oiseaux – est le foie, tandis que cette voie anabolique est assurée aussi bien par le foie que le tissu adipeux chez les rongeurs. Néanmoins, du fait de la diversité susmentionnée des rôles joués par les lipides, les autres tissus de l'organisme assurent presque tous une activité lipogénique plus ou moins importante.

1.3.3.2 Les sources et la synthèse des précurseurs de la DNL

C'est l'acétyl-CoA, produit de divers processus cataboliques (comme la glycolyse et l'oxydation des lipides), qui sert de précurseur à la voie de la DNL. Les enzymes clefs de la DNL sont désignées comme les « enzymes lipogéniques ». Il s'agit, dans leur ordre d'intervention, des enzymes *acetyl-CoA carboxylase* (ACC), *fatty acid synthase*

(FASN), Δ -9-Stearoyl-CoA desaturase 1 (SCD-1) et Elongation of very long-chain fatty acids proteins 1-7 (ELOVL1-7) (Kihara, 2012). L'enzyme ACC catalyse une réaction de carboxylation qui, en oxydant du HCO₃⁻ dissout et en hydrolysant de l'ATP en ADP+Pi, transforme l'acétyl-CoA en malonyl-CoA, une molécule à deux atomes de carbone. Cette dernière devient alors la fournisseuse des paires de carbones nécessaires à l'élaboration séquentielle subséquente des acides gras à longues chaînes (Strable et Ntmabi, 2010 ; Clarke et Nakamura, 2004 ; Lodhi *et al.*, 2011 ; Rui , 2014 ; Ameer *et al.*, 2014).

1.3.3.3 La biosynthèse des acides gras libres saturés à longues chaînes

La phase de la DNL qui consiste à synthétiser du palmitate, un acide gras saturé à 16 atomes de carbone, est opérée par le complexe multi-enzymatique de la FASN. Cette dernière est un homodimère d'un poids moléculaire de 260 KDa. Chez les organismes supérieurs, l'enzyme multifonctionnelle FASN de type 1 bien qu'ubiquitaire reste davantage exprimée dans les tissus métaboliquement actifs comme le foie et le tissu adipeux. Les sept groupes catalytiques actifs distincts de l'enzyme assurent l'addition séquentielle des paires de carbones fournies par le malonyl-CoA dans une série de réactions qui consistent à transformer 7 molécules de malonyl-CoA et une molécule d'acétyl-CoA, en palmitate. Ces réactions réductrices requièrent l'oxydation de 14 molécules de NADPH (Wakil, 1989, Lodhi et al., 2011). La synthèse de palmitate catalysée par la FASN se fait par l'agencement séquentiel des briques à deux atomes de carbone fournies sous la forme de malonyl-CoA, au cours d'une série complexe de réactions (avec 30 intermédiaires acylés) qui peuvent se résumer en trois grandes étapes : l'étape de recrutement des deux substrats acétyl-CoA et malonyl-CoA en vue de leur condensation, l'étape répétitive de réduction de la chaîne d'acide gras permettant son allongement séquentiel, puis l'étape de libération de l'acide gras libre achevé à 16 atomes de carbone. Les trois étapes sont réalisées simultanément et en série par trois domaines distincts présents sur chacune des deux sous-unités de l'enzyme FASN (Wakil, 1989; Lodhi et al., 2011).

Une fois la première phase de la DNL terminée, les étapes qui suivent concernent davantage les modifications apportées au « produit brut » qui est le palmitate.

1.3.3.4 L'élongation et la désaturation des acides gras endogènes

Étant donné que les lipides destinés à des fonctions structurelles ou endocrines sont en grande partie des chaînes d'acides gras à 18 atomes de carbone ou plus, une partie du palmitate produit par FASN sert de substrat à l'enzyme *Elongase of long-chain fatty acids family member 6* (ELOVL6). Cette enzyme ubiquitaire identifiée en 2001, soit relativement récemment (Ya *et al.*, 2001), est caractérisée comme étant une enzyme microsomale associée à la membrane du réticulum endoplasmique et dont la fonction consiste à rallonger les chaînes d'acides gras par l'ajout de deux atomes de carbone à leur fonction acide carboxylique. Aussi bien les chaînes acylées de palmitate (C16:0) produites lors de la DNL que celles issues de la diète, peuvent être transformées par l'enzyme ELOVL6 en stéarate (C18:0). Par ailleurs, ELOVL6 permet l'élongation des chaînes d'acides gras saturés et monoinsaturés longues de 12, 14 et 16 atomes de carbone fournis essentiellement par la diète (Matsuzaka *et al.*, 2012 ; Ya *et al.*, 2001 ; Strable et Ntambi, 2010). Le palmitate et le stéarate ainsi générés peuvent alors être mobilisés pour des fonctions structurelles, endocriniennes et énergétiques, suite à l'ultime étape de la DNL, celle de la désaturation des acides gras.

Les acides gras à longues chaînes monoinsaturées entrent principalement dans la composition des triglycérides et des bicouches phospholipidiques où ils participent respectivement au stockage de l'énergie et à la structure cellulaire. La désaturation des acides gras, au terme de la DNL, est catalysée par les enzymes Stéaroyl CoA désaturases (SCD) dont il existe deux isoformes chez l'humain : l'isoforme SCD-5 exprimé essentiellement dans le cerveau et le pancréas, et l'isoforme SCD-1 ubiquitaire, davantage exprimé par les hépatocytes. C'est l'isoforme SCD-1 qui est le plus impliqué dans l'anabolisme des lipides. Il s'agit d'une enzyme ancrée dans la membrane du réticulum endoplasmique à la manière de l'ELOVL6 (Miyazaki *et al.*, 2007). SCD-1 catalyse la monoinsaturation, c'est-à-dire l'incorporation d'une seule double liaison

covalente, en position Δ -9 (neuvième atome de carbone numéroté à partir de l'atome de carbone de la fonction acide carboxylique) des acides gras découlant de la DNL. Cette réaction de réduction requiert, outre la présence de l'enzyme SCD-1, la présence du pouvoir réducteur NADH, de la stéaroyl-Coenzyme A, de l'oxygène, des acides gras à longue chaîne saturés (préférentiellement du palmitate ou du stéarate), de l'enzyme cytochrome-b réductase, et du cytochrome-b en guise de premier donneur d'électron. Le palmitate synthétisé par l'enzyme FASN ainsi que le stéarate produit par ELOVL6 sont les principaux substrats de l'enzyme SCD-1 qui les transforme respectivement en palmitoléate (C16:1n-7) et en oléate (C18:1n-9) (Strittmter *et al.*, 1974 ; Strable et Ntambi, 2010 ; Mauvoisin et Mounier, 2011 ; Ntambi, 2013).



Figure 1.3 : La voie anabolique de la lipogenèse *de novo* (DNL) et sa régulation. Le glucose capté par les cellules alimente les voies de la glycolyse puis du cycle de Krebs, pour produire du citrate. Ce dernier, lorsqu'accumulé en excès dans un contexte

de bilan énergétique positif, est converti par ACLY en acétyl-CoA qui est converti en malonyl-CoA par ACC. L'acétyl-CoA et le malonyl-CoA servent de précurseur à la DNL pour la biosynthèse d'acides gras saturés et monoinsaturés de tailles variables, ainsi que des triglycérides (stockés ou sécrétés *via* les VLDL) et des phospholipides. La voie de signalisation PI3K/AKT, activée par les facteurs de croissance et l'insuline, stimule la translocation nucléaire du facteur de transcription SREBP1 maître régulateur des gènes lipogéniques GLUT (*glucose transporter*) ; Glucose 6P (*glucose-6-phosphate*) ; G6PDH (*glucose-6-phosphate dehydrogenase*) ; GF (*growth factor*), PI3K (*phosphoinositide 3-kinases*) ; AKT (protein kinase B) ; ACL (*ATP-citrate lyase*) ; SREBP1 (*sterol regulatory element-binding protein-1*) ; ACC (*acetyl-CoA carboxylase*) ; FAS (FASN, *fatty acid synthase*) ; ME (*malic enzyme*) ; NADPH (*nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase*) ; TG (*triglycérides*) ; PL (*phospholipids*) ; SCD1 (*stearoyl CoA desaturase 1*) ; ELOVL6 (*Elongase of long-chain fatty acids family member 6*) ; VLDL (*very low density lipoproteins*). (Mounier *et al.*, 2014).

1.3.3.5 L'estérification puis le stockage des réserves lipidiques néoformées

Les acides gras synthétisés *de novo* sont coactivés par l'enzyme ACS puis estérifiés par les enzymes de la membrane du réticulum endoplasmique *glycérol-3-phosphate acyltranferase* (GPAT), *acylglycérophosphate acyltranférase* (AGPAT), *phosphatidic acid phosphohydrolase* (PAP), et *diacylglycerol acyltransferase* (DGAT), en lipides neutres (figure 1.4). Ces derniers consistent en des diglycérides et des triglycérides servant de réserves d'énergie, mais consistent également en des acides phosphatidiques qui servent de précurseurs à la synthèse des phospholipides aux fonctions de structure et de transduction de signaux (Coleman & Mashek, 2011; Guo *et al.*, 2009; Kohlwein *et al.*, 2013). Se déroulant essentiellement dans les entérocytes, les hépatocytes et les adipocytes, la voie d'estérification des acides gras requiert du glycérol-3-phosphate libre qui provient de la dégradation du dihydroxyacétone phosphate lors de la glycolyse ou du processus de glycéronéogenèse à partir du pyruvate et du malate (Nye *et al.*, 2008). Sous l'action de la GPAT, un groupement glycérol-3-phosphate libre est estérifié en position sn-1 avec un acyl-CoA pour générer une molécule d'acide lysophosphatidique. L'acide lysophosphatidique, sous l'action de l'AGPAT, est à son

tour estérifié en position sn-2 avec un autre acide gras libre acylé pour générer de l'acide phosphatidique. À ce state, les acides gras estérifiés destinés à des rôles de stockage d'énergie sont départis de leur groupement phosphate. Cette réaction d'hydrolyse est catalysée par la phosphohydrolase de l'acide phosphatidique (PAP). L'acide phosphatidique est ainsi transformé en diglycéride dont une dernière estérification en position sn-3, catalysée par l'enzyme DGAT, avec un acyl-CoA, génère un triglycéride (Coleman et Mashek, 2011 ; Athenstaedt Daum, 2006 ; Foster *et al.*, 2014 ; Nye *et al.*, 2008). Les triglycérides et les diglycérides néoformés s'accumulent entre les deux feuillets de la membrane du réticulum endoplasmique, faisant émerger graduellement des gouttelettes lipidiques à partir du réticulum, selon le « modèle standard du bourgeonnement des gouttelettes » schématisé dans la figure 1.4 (Coleman & Mashek, 2011; Guo *et al.*, 2009; Kohlwein *et al.*, 2013).



Figure 1.4 : Synthèse des triglycérides et des gouttelettes lipidiques selon le modèle standard du bourgeonnement. Les acides gras libres synthétisés *de novo* ou

internalisés sont acylés par l'ACS puis transformés, par les enzymes ancrées dans la membrane du réticulum endoplasmique GPAT, AGPAT, PAP et DGAT, en LPA, PA, DAG et TAG, respectivement. Les DAG et les TAG, de même que les esters de stérols, hydrophobes et non amphipatiques, s'accumulent par interactions hydrophobes entre les deux feuillets du réticulum, causant le bourgeonnement progressif d'une monocouche phospholipidique dont la forme mâture est une « proto- » gouttelette lipidique. Cette dernière, une fois séparée du réticulum, s'enrichit en périlipines et entreprend des événements de fusion et de fissions, et accroit son cargo grâce à l'action constitutive des enzymes membranaires estérifiantes héritées du réticulum, formant la gouttelette lipidique mâture et dynamique, proprement dite DNL (de novo lipogenesis) FFAs (free fatty acids); ACS (acyl-CoA synthase); GPAT (glycerol-3-phosphate acyltransferase); LPA (lysophospatidic acid); AGPAT (1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase); PA (phosphatidic acid); PAP (phosphatidic acid phosphohydrolase); DAG (diacylglycerols, diglycérides); DGAT (diacylglycerol acyltransferase); TAG (triacylglycerols, triglycérides); LD (lipid droplets); PLIN (perilipins). (Lounis et al., 2015a).

1.3.4 La régulation transcriptionnelle des effecteurs de la DNL

L'expression des enzymes impliquées dans l'anabolisme des lipides est essentiellement modulée au niveau transcriptionnel. Les principaux facteurs de transcription impliqués dans cette régulation sont les protéines *upstream stimulatory factor 1* (USF-1), *sterol regulatory element-binding protein-1C* (SREBP-1c), carbohydrate response element (ChREBP) et *Liver X receptor* (LXR) (Ameer *et al.*, 2014; Strable & Ntambi, 2010; Wang *et al.*, 2015b). Lorsqu'activés par les divers mécanismes mentionnés plus bas, ces facteurs de transcription se lient à leurs éléments de réponses (RE, pour *response element*) situés dans les régions promotrices de la plupart des gènes lipogéniques (mais aussi de leurs propres gènes), pour en activer l'expression. Il s'agit, dans l'ordre, des éléments *E-box* (lié par USF-1), *sterol response element* (SRE, lié par SREBP1c), *carbohydrate response element* (ChoRE, lié par ChREBP), et *LXR response element* (LXRE, lié par LXR). Tous ces RE se retrouvent en amont des gènes lipogéniques *FASN, ACC, ACLY, SCD-1, GPAT*, et certains d'entre eux en amont des gènes prolipogéniques *SREBP-1, LXR*, pyruvate kinase (*PK*) et glucokinases (Ameer *et al.*, 2014; Strable & Ntambi, 2010; Wang *et al.*, 2015b), tel que synthétisé dans le tableau 1.1. L'activation de ces facteurs de transcription est elle-même sujette à une régulation impliquant les hormones et les nutriments.

Tableau 1.1 : Les principaux facteurs de transcriptions prolipogéniques, leurs domaines de liaisons, leurs gènes cibles, et leurs modes de régulations. (Wang *et al.*, 2015b).

Transcription factor	Binding site	Target genes	Activation	Inactivation
USF1	E-box 5'-CANNTG-3'	Srebp1c, Fas, Acc, Acly, Scd1 and mGpat	 P-S262 by DNA-PK AC-K237 by PCAF 	deAC-K237 by HDAC9
SREBP1C	SRE 5'-TCACNCCAC-3'	Srebp1c, Fas, Acc, Acly, Scd1, mGpat, pyruvate kinase and glucokinase	 P-S117, P-S63 and P-T426 by MAPK AC-K289 and K309 by p300 	 P-S31 and P-S314 by PKA P-S372 by AMPK deAC-K289 and deAC-K309 by SIRT
ChREBP	ChoRE 5'-CAYGNGN ₅ CNCRTG-3'	Lpk, Fas, Acc, Acly and Scd1	 deP-S196 and deP-T666 by PP2A AC-K672 by p300 O-GlcNAcylation or O-GlcNAc 	 P-S196 and P-T666 by PKA P140 and P196 by PKA P-586 by AMPK
LXR	LXRE 5'-AGGTCAN ₄ AGGTCA-3'	Srebp1c, Chrebp, Lxr, Fas and Acc	O-GlcNAcylation or O-GlcNAc	P-S195, P-S196, P-S290 and P-S291 by PKA

1.3.5 La régulation hormonale et nutritionnelle de la DNL

Dans des conditions postprandiales, l'élévation globale de la glycémie et de la lipémie induit la sécrétion de l'insuline qui est de loin la plus importante hormone activatrice de l'anabolisme des lipides. D'autres hormones proches d'un point de vue fonctionnel comme certains facteurs de croissance incluant l'*Epidermal growth factor* (EGF) et le *Platelet-derived growth factor* (PDGF), mais aussi les hormones thyroïdiennes (T3 et T4) (Radenne *et al.*, 2008), peuvent agir en synergie avec l'insuline à cet effet (Ameer *et al.*, 2014; Mounier *et al.*, 2014; Strable & Ntambi, 2010; Wang *et al.*, 2015b).

Dans la plupart des tissus métaboliques, l'insuline interagit avec son récepteur membranaire (IR, pour *insulin receptor*) dont l'autophosphorylation en résidus tyrosines active simultanément deux grandes voies de signalisations, celle des MAPK et celle des PI3K/AKT/mTOR (Capeau, 2003; Kersten, 2001). La voie des MAPK

régule la prolifération cellulaire, tandis que la voie des PI3K/AKT/mTOR active de nombreuses réponses cellulaires comme la protéosynthèse médiée notamment par la p70s6 Kinase (p70s6K) en même temps qu'elle inhibe d'autres voies comme celle de l'autophagie (Capeau, 2003; Kersten, 2001). Tandis que des études menées notamment au sein de notre laboratoire ont démontré que la voie des MAPK activait l'expression du gène FASN notamment (Radenne et al., 2008), celle des PI3k/AKT/mTOR est décrite de manière consensuelle comme aboutissant à l'activation post-traductionnelle du facteur SREBP-1c et donc de la DNL dans son ensemble (Krycer et al., 2010). En parallèle, la même voie induit l'expression puis la translocation membranaire des transporteurs glucose transporter (GLUT), dont le transporteur GLUT-2 exprimé par les hépatocytes, favorisant ainsi l'internalisation du glucose (Capeau, 2003). Les produits de la dégradation de ce dernier, par la glycolyse, servent de précurseurs à la DNL d'une part (comme décrit plus haut). D'autre part, le glucose-6-phosphate, précurseur de la glycolyse, de même que le xylulose-5-phosphate, produit de la voie des pentose-phosphate, sont les principaux inducteurs de la translocation nucléaire et de l'activité transcriptionnelle du facteur ChREBP (Dentin et al., 2012; Iizuka & Horikawa, 2008; Postic & Girard, 2008a). Par ailleurs, il a été observé que l'insuline active, par des mécanismes mal élucidés, l'activation du facteur USF-1 et du facteur LXR (Wang *et al.*, 2015b). Le facteur LXR serait en outre activé, selon certaines études, par interaction directe avec le glucose et ses métabolites (Korach-Andre & Gustafsson, 2015; Postic & Girard, 2008a).

Outre l'action hormonale, une récente étude menée au sein de notre laboratoire a démontré que l'acide oléique, faisant partie des acides gras monoinsaturés qui représentent près du tiers des lipides alimentaires, interagit avec la forme mature du facteur SREBP1c, accroit sa translocation nucléaire, et stimule la DNL (Lounis *et al.*, 2017). Cela démontre que les lipides exogènes ont la capacité d'induire la DNL.

Agissant essentiellement au niveau des différents types de tissus adipeux, mais aussi de manière ubiquitaire dans une moindre mesure notamment au niveau hépatique, le facteur de transcription *peroxisomal proliferator-activated receptor gamma* (PPARγ)

est un activateur non négligeable de l'anabolisme des lipides (Ahmadian *et al.*, 2013). PPAR γ favorise la captation des lipides, l'internalisation des sucres, la réponse à l'insuline, la DNL, et l'accumulation des triglycérides de même que l'adipogenèse (Ahmadian *et al.*, 2013), lorsqu'activé *post-prandium* par ses ligands qui sont des acides gras ou des dérivés d'acides gras (comme les LCFA polyinsaturés) (Ahmadian *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2015b). Plus de détails concernant les mécanismes activateurs et les effets de PPAR γ , ainsi que des autres membres de la famille des PPARs, seront abordés plus bas pour leurs rôles clefs dans l'homéostasie des lipides.

1.4 Le transport systémique des lipoprotéines

Les transporteurs lipoprotéiques indispensables au transport des triglycérides et des esters de stérols à travers l'organisme sont les chylomicrons, les VLDL, les LDL et les HDL (respectivement les Very low-, low-, et high-density lipoproteins) (Charlton-Menys & Durrington, 2008; Gagné et al., 2007). Un apercu général du transport lipoprotéique est proposé en figure 1.5. Au niveau des entérocytes, les acides gras et le cholestérol internalisés, une fois estérifiés, sont complexés à l'apolipoprotéine ApoB48 par une réaction catalysée par l'enzyme MTP, pour générer les chylomicrons (Charlton-Menys & Durrington, 2008; Gagné et al., 2007). Ces derniers sont sécrétés par les régions basales des entérocytes, avant de migrer à travers l'organisme dans les vaisseaux sanguins où les LPL tapissant les surfaces luminales endothéliales, en hydrolysent l'essentiel des triglycérides (Charlton-Menys & Durrington, 2008; Gagné et al., 2007). Les chylomicrons résiduels sont ainsi progressivement appauvris en triglycérides et (relativement) enrichis en cholestérol, alors que les monoglycérides et les acides gras libres produits par la réaction sont internalisés par les tissus environnants (Charlton-Menys & Durrington, 2008; Gagné et al., 2007). Les chylomicrons résiduels sont pour la plupart internalisés par le foie grâce aux LDL receptor-like proteins (LRP) puis métabolisés (Charlton-Menys & Durrington, 2008; Gagné et al., 2007). Ce mécanisme permet au foie de récupérer presque tout le cholestérol provenant de l'intestin mais aussi les triglycérides. Pour sa part, le foie exporte une large partie de son cholestérol et de ses triglycérides vers les autres tissus via les VLDL essentiellement. (Charlton-Menys & Durrington, 2008; Gagné et al., 2007). La synthèse des VLDL dans le RE des hépatocytes ressemble beaucoup à celle des chylomicrons par les entérocytes. À la différence des chylomicrons, cependant, les VLDL sont formés par l'association des triglycérides et des esters de cholestérol avec l'ApoB100 et non avec l'ApoB48 (Charlton-Menys & Durrington, 2008; Gagné et al., 2007). Les VLDL sont sécrétés par les hépatocytes directement dans le système sanguin où ils continuent de s'enrichir en ester de cholestérol notamment grâce à l'action de l'enzyme cholesteryl ester transport protein (CETP) qui leur transfert des esters de cholestérol à partir des HDL et des LDL (Charlton-Menys & Durrington, 2008; Gagné et al., 2007). Cet enrichissement progressif en cholestérol est également dû à l'action des LPL sur les VLDL, comme pour les chylomicrons. Ainsi le VLDL est graduellement transformé en LDL. Cette dernière, de petite taille, peut traverser les épithélia vasculaires de la plupart des tissus (sauf le système nerveux central) pour les approvisionner en cholestérol. Lorsqu'ils en contiennent en excès (c'est-à-dire en concentrations potentiellement lipotoxiques), les tissus périphériques exportent leur cholestérol via les transporteurs membranaires ATP-binding cassette A1 (ABCA1) (Charlton-Menys & Durrington, 2008; Gagné et al., 2007). Le cholestérol sécrété est alors capté, dans la circulation, par les HDL avant d'être transféré par l'enzyme CETP vers les VLDL appelés à se transformer en LDL ; c'est ce qu'on appelle le transport inverse du cholestérol (TIC). Les LDL sont finalement éliminés de la circulation par le foie qui les internalise et les dégrade via les LDL receptor (LDLR) (Charlton-Menys & Durrington, 2008; Gagné et al., 2007). De leur côté, les HDL peuvent aussi être captés directement par le foie via le récepteur scavenger receptor B1 (SRB1). Le foie sert ainsi de réceptacle à l'excès de cholestérol et de lipides divers qui affluent des différents tissus périphériques, en vue de les recycler, de les incorporer à ses propres structures, ou e les excréter via les acides biliaires (Charlton-Menys & Durrington, 2008; Gagné et al., 2007). Le transport lipoprotéique global est schématisé ci-après.



Figure 1.5 : Le transport des lipoprotéines chez l'humain. Se référer au texte du paragraphe précédent pour les explications. ApoB48, A1 & B100 (*apolipoproteins B48, A1 & B100*) ; TG (*triglycerides*) ; LRP (*LDL receptor-like protein*) ; LDL (*low density lipoproteins*) ; ABCA1 (*ATP-binding cassette A1*) ; SRB1&A1 (*scavenger receptor B1 & A1*) ; CETP (*cholesteryl ester transport protein*) ; VLDL (*very low density lipoproteins*) ; IDL (*intermediate density lipoprotein*) ; CD36 (*cluster of differentiation 36*). (Charlton-Menys & Durrington, 2008).

1.5 Le catabolisme des lipides

Le *continuum* des réactions du catabolisme lipidique se décline en deux grandes étapes : la lipolyse puis l'oxydation des acides gras qui permet d'alimenter la synthèse de l'ATP et la thermogenèse par les mitochondries (Ahmadian *et al.*, 2007; Berlanga *et al.*, 2014a; Calderon-Dominguez *et al.*, 2016).

1.5.1 La lipolyse neutre

1.5.1.1 Les étapes de la voie de la lipolyse

La lipolyse est la voie catabolique qui consiste à mobiliser, majoritairement, les triglycérides et les diglycérides stockés dans les gouttelettes lipidiques en vue de les désestérifier pour libérer des acides gras et des groupements glycérol (Lass *et al.*, 2011). Les acides gras libres peuvent subséquemment être oxydés (Lass *et al.*, 2011), tel que décrit plus bas, pour générer de l'énergie chimique sous forme d'ATP ou physique sous forme de chaleur (thermogenèse). Quant au groupement glycérol, il peut être recyclé pour régénérer des lipides estérifiés, ou tout simplement être libéré de la cellule (Mugabo *et al.*, 2017; Schweiger *et al.*, 2014).

Considérant le rôle incontournable qu'elle joue dans la régulation du métabolisme des lipides et donc de l'énergie cellulaire, il n'est pas étonnant que la lipolyse soit une voie ubiquitaire (active dans toutes les cellules de l'organisme). Toutefois, ce sont les adipocytes blancs (Langin, 2006) et bruns (Heeren & Scheja, 2018), ainsi que les fibres oxydatives de type I des muscles squelettiques (Jocken *et al.*, 2008) qui possèdent la plus grande activité lipolytique.

Les trois séquences de cette voie font intervenir le trio enzymatique que constituent l'*adipose triglyceride lipase* (ATGL), l'*hormone sensitive lipase* (HSL) et la *monoglycerol lipase* (MGL), toutes les trois localisées à la périphérie de la gouttelette lipidique durant la lipolyse (Lass *et al.*, 2011). Ces trois enzymes ayant un pH optimal de 7, la lipolyse qu'elles catalysent est dite « neutre » en opposition à la lipolyse

(relativement marginale) dite « acide » qui se déroule dans les lysosomes et qui sera évoquée plus bas (Calderon-Dominguez *et al.*, 2015).

L'enzyme ATGL a pour substrats exclusifs les triglycérides dont elle catalyse l'hydrolyse du pont ester en position sn-2 (Eichmann *et al.*, 2012), produisant un acide gras libre et un diglycéride (Lass et al., 2011; Zimmermann et al., 2004). Elle permet donc d'effectuer l'étape initiale de la lipolyse, que plusieurs décrivent comme l'une des étapes cinétiquement limitantes. En parallèle, intervient l'enzyme HSL qui, à l'état activé, est en mesure de catalyser l'hydrolyse d'une vaste gamme de lipides estérifiés. Cela inclut les triglycérides, les diglycérides, les monoglycérides, ainsi que les esters de cholestérol (Kraemer & Shen, 2006; Kraemer & Shen, 2002). Toutefois, l'activité hydrolytique de la HSL vis-à-vis des diglycérides et des esters de cholestérol est de 10 fois et 5 fois plus élevée que son activité hydrolytique vis-à-vis des triglycérides et des monoglycérides, respectivement (Kraemer & Shen, 2006; Kraemer & Shen, 2002). Pour cette raison, il est plus simple de considérer la HSL comme la « seconde » enzyme de la voie de la lipolyse, avec pour principale fonction l'hydrolyse d'un pont ester en position sn-3 ou sn-1, à priori sans préférence (Eichmann et al., 2012), des diglycérides. Cette réaction génère un acide gras libre et un monoglycéride (Kraemer & Shen, 2006; Kraemer & Shen, 2002). Pour finir, l'enzyme MGL catalyse l'ultime étape de la lipolyse, soit l'hydrolyse d'un diglycéride en un acide gras et une molécule de glycérol libres (Karlsson et al., 1997; Lass et al., 2011). Une partie du glycérol libre est sécrété par les cellules au moyen des aquaglycéroporines ; il se retrouve alors en circulation dans le sang avant d'être capté puis métabolisé parle foie et les reins (Xue et al., 2017). Le glycérol restant dans la cellule peut être converti par la glycogen kinase en G3P qui peut, à son tour, soit être mobilisé pour la synthèse des TG, soit intégrer la voie de la glycolyse, en étant converti par la G3P déshydrogénase en dihydroxyacétone phosphate (DHAP), en vue d'être oxydé (Xue et al., 2017).

1.5.1.2 La régulation de la lipolyse

La voie de la lipolyse est activée ou inhibée (figure 1.6) selon la demande énergétique de l'organisme. L'activité de la lipolyse est déterminée par les modifications transcriptionnelles et post-traductionnelles apportées aux enzymes impliquées par plusieurs facteurs endocriniens (Galsgaard *et al.*, 2019), nerveux (Zhu *et al.*, 2019) et nutritionnels (Kershaw *et al.*, 2006). Tandis qu'elle est constitutive ailleurs, c'est principalement au niveau des tissus adipeux blancs et bruns, et du muscle cardiaque, que la lipolyse est régulée (Calderon-Dominguez *et al.*, 2015; Kim *et al.*, 2016; Schreiber *et al.*, 2017).

Le modèle classique de la régulation de la lipolyse implique les mécanismes régissant la phosphorylation et la translocation de l'enzyme HSL vers la gouttelette lipidique (Lass *et al.*, 2011). De cela dépend le flux de la lipolyse, faisant de la HSL aussi une enzyme cinétiquement limitante de la voie. Sa forme native non modifiée est en revanche inactive.

La noradrénaline libérée lors d'une stimulation adrénergique par le système nerveux autonome sympathique (SNS), les autres catécholamines agonistes de la voie β 3adrenergique du SNS, ou encore le glucagon sécrété par les cellules α du pancréas en cas d'hypoglycémie, sont de puissants inducteurs de la lipolyse (Calderon-Dominguez *et al.*, 2015; Calderon-Dominguez *et al.*, 2016; Galsgaard *et al.*, 2019; Lass *et al.*, 2011). Lorsqu'ils lient puis activent leurs récepteurs respectifs à la surface des adipocytes, cela se traduit par une hausse des niveaux intracellulaires de l'AMP cyclique qui sert de second messager pour l'activation de la protéine kinase A. Cette dernière active à son tour l'enzyme HSL cytosolique par phosphorylation directe (sur le résidu Ser650 de l'isoforme humain et sur le résidu Ser660 pour l'isoforme murin). Dans le même temps, la protéine kinase A phosphoryle aussi la périlipine (protéine de la périphérie des gouttelettes lipidiques) de type 1 qui devient apte à interagir physiquement avec l'enzyme HSL phosphorylée. C'est ainsi que la HSL activée peut colocaliser avec la gouttelette lipidique pour y remplir sa fonction lipolytique (Calderon-Dominguez *et al.*, 2015; Calderon-Dominguez *et al.*, 2016; Galsgaard *et al.*, 2019; Lass *et al.*, 2011).

Les glucocorticoïdes activent aussi la lipolyse, mais pas par l'intermédiaire direct d'un GPCR (Koliwad *et al.*, 2012). Ils activent l'expression (et, de manière corrélée dans ce cas précis, l'activité enzymatique) de l'ANGPTL4 adipocytaire (évoquée plus haut pour son rôle d'inhibiteur de la LPL) qui, à son tour, potentialise la conversion de l'AMP en AMPc par les catécholamines (Koliwad *et al.*, 2012).

En parallèle de l'activation de l'enzyme HSL, c'est également l'activité de l'ATGL qui est indirectement gouvernée par la protéine kinase A par l'intermédiaire de l'*ATGL co-activator comparative gene identification-58* (CGI-58), une protéine ancrée dans la membrane des gouttelettes lipidiques (Lass *et al.*, 2006). Lorsque la lipolyse est inactive, CGI-58 est physiquement liée et séquestrée par la périlipine 1. Mais lorsque cette dernière est phosphorylée par la protéine kinase A, elle libère la protéine CGI-58 qui peut alors interagir avec l'enzyme ATGL pour l'activer en la débarrassant de la protéine inhibitrice *G0/G1 switch gene 2* (G0S2) (Lass *et al.*, 2006).

La principale hormone qui module la voie de la lipolyse à la baisse est l'insuline (Calderon-Dominguez *et al.*, 2015; Chakrabarti *et al.*, 2013). Au moins deux mécanismes ont été identifiés. La liaison de l'insuline à son récepteur (hautement exprimé à la surface des adipocytes notamment) active la voie insulinique de la *Phosphoinositide 3-kinase* (PI3K) qui se traduit, entre autres, par la phosphorylation activatrice de la *protein kinase B/AKT* (AKT) et du complexe mTORC1 en aval (Boucher *et al.*, 2014). La kinase AKT stimule alors la phosphorylation de la phosphodiestérase 3 B qui catalyse la reconversion de l'AMPc en AMP, inhibant de ce fait la PKA (Calderon-Dominguez *et al.*, 2015). En outre, le complexe mTORC1 active le facteur de transcription du gène *ATGL* (Chakrabarti *et al.*, 2013). C'est peut-être ce qui explique, d'ailleurs, que l'effet inhibiteur de l'insuline sur la lipolyse domine largement l'effet activateur du glucagon, tel que documenté depuis longtemps (Brockman, 1976; Lefebvre & Luyckx, 1969).

Ce sont donc aussi bien l'enzyme HSL que l'ATGL qui sont cinétiquement limitantes pour la lipolyse.



Figure 1.6 : Déroulement et régulation de la lipolyse. Récapitulatif des événements moléculaires permettant l'hydrolyse séquentielle d'un triglycéride en trois acides gras libres et un glycérol, ainsi que la régulation de l'expression, de l'activité et de la localisation fonctionnelle des enzymes lipolytiques clefs en réponse à deux stimulations hormonales (insuline et norépinéphrine) aux effets antagonistes. De gauche à droite : ATGL (*Adipose triglyceride lipase*), EGR1 (*Early growth response protein 1*), mTORC1 (*mechanistic target of rapamycin complex 1*), Perilipin (périlipine), G0S2 (*G0/G1 switch gene 2*), CGI-58 (*ATGL co-activator comparative gene identification-58*), HSL (*Hormone sensitive lipase*), MGL (*monoglyceride lipase*), LD (gouttelette lipidique), FFA (acide gras libre), TG (triglycéride), DG (diglycéride), MG (monoglycéride), P (groupement phosphate), PKB (*Protein kinase*)

B ou AKT), IR (récepteur à l'insuline), PDE3B (phosphodiestérase 3 B), AMP (adénosine monophosphate), AMPc (adénosine monophosphate cyclique), PKA (protéine kinase A), β AR (récepteur adrénergique bêta), NE (norépinéphrine, ou noradrénaline), AC (adénylate cyclase). Modifié à partir de Calderon-Dominguez *et al.* (2016) et partiellement inspiré des travaux de Chakrabarti *et al.* (2013).

1.5.2 Les voies d'oxydation des acides gras

La principale voie oxydative des lipides, aussi appelée β -oxydation, est une voie catabolique cruciale pour l'approvisionnement de l'organisme en énergie (Adeva-Andany et al., 2019; Bartlett & Eaton, 2004; Kumari, 2018). Chez l'animal, la βoxydation se déroule essentiellement dans la mitochondrie. Les acides gras libres, à chaînes courtes, moyennes ou longues (jusqu'à 18 atomes de carbone), sont issus de la captation des acides gras et de la lipolyse. Les acides gras activés par estérification avec la Coenzyme A (CoA) grâce aux ACSL situées sur la face interne de la membrane plasmique et sur la membrane externe mitochondriale, subissent la β -oxydation mitochondriale. Cette voie catabolique ne produit pas directement de l'énergie chimique, mais elle permet de régénérer du pouvoir réducteur (sous forme de NADH et de FADH₂) et de l'acétyl-CoA. Ces composés sont par la suite oxydés via le cycle de Krebs qui fournit à son tour plus de pouvoir réducteur à même d'alimenter la phosphorylation oxydative mitochondriale nécessaire à la biosynthèse de l'ATP (Adeva-Andany et al., 2019; Bartlett & Eaton, 2004; Kumari, 2018). Par exemple, l'oxydation complète d'une molécule de palmitoyl CoA (un acide gras saturé à 16 atomes de carbone lié à la Coenzyme A) génère un rendement net estimé à 106 molécules d'ATP (Berg JM, 2002), tel que schématisé dans la figure suivante.



Figure 1.7 : Estimation de l'énergie chimique utile libérée après l'oxydation complète de l'acide palmitique. Deux molécules d'ATP sont consommées pour permettre de générer, à partir d'une molécule d'acide palmitique, un palmitoyl-CoA. Ce dernier est dégradé en 8 molécules d'acétyl CoA au cours d'un processus qui permet de réduire 7 molécules de NAD⁺ et 7 molécules de FAD⁺ en NADH et FADH2, respectivement. Les 8 molécules d'acétyl-CoA sont ensuite oxydées *via* le cycle de Krebs, générant davantage de pouvoir réducteur. L'ensemble des molécules de FADH2 et de NADH alimentent ensuite la chaîne mitochondriale de transport des électrons pour permettre la phosphorylation oxydative (non représentés sur la figure) et la synthèse de 108 molécules d'ATP. Le gain énergétique net pour 1 acide palmitique oxydé est estimé à 106 ATP. Données obtenues grâce à Berg *et al.*, 2002.

1.5.2.1 L'oxydation des acides gras par la mitochondrie

Les acides gras à chaînes longues (LCFA, pour *long-chain fatty acids*) possèdent une queue aliphatique de 12 atomes de carbone et plus. Une fois transformés en acyl-CoA, leur translocation à travers les membranes mitochondriales ne peut se faire que par l'entremise de transférases. Le modèle classique du transfert d'un acyl-CoA du cytosol vers la mitochondrie est schématisé dans la figure 1.8. Sur la membrane externe de la mitochondrie, se trouve l'enzyme *carnitine palmitoyl transferase 1* (CPT1). Sa fonction est de capter puis de co-transporter vers l'espace intermembranaire mitochondrial, un acyl-CoA et une molécule de carnitine. Pour cela, CPT1 désestérifie l'acyl-CoA et transfert le groupement acyl vers la carnitine. Cette réaction produit une molécule d'acyl-carnitine qui se retrouve dans l'espace intermembranaire mitochondrial. Ancrée dans la membrane interne de la mitochondrie, l'enzyme *carnitine acylcarnitine translocase* (CACT) lie l'acyl-carnitine intermembranaire puis

remplace la carnitine par une coenzyme A qu'elle prélève depuis la matrice mitochondriale. La carnitine est externalisée vers le cytosol pour un usage ultérieur similaire, tandis que l'acyl-CoA néoformé est immédiatement capté puis transféré vers la matrice mitochondriale par une autre enzyme de la membrane mitochondriale interne, *carnitine palmitoyl transferase 2* (CPT2). Ainsi la carnitine sert de navette pour le transport facilité des acyl-CoA à chaînes longues à l'intérieur de la mitochondrie.



Figure 1.8 : Transfert de l'acétyl-CoA du cytosol vers la mitochondrie par le système CPT. Se référer au texte du paragraphe précédent pour les explications détaillées du système de la navette carnitine schématisé. La flèche rouge indique l'action inhibitrice exercée par le malonyl-CoA sur la fonction de CPT1. CPT1&2 (carnitine palmitoyl transferases I and II) ; CoA (Coenzyme A) ; CACT (carnitine acylcarnitine translocase). Figure modifiée à partir de Bartlett & Eaton (2004).

Les acides gras à chaînes courtes, longs de 1 à 6 atomes de carbone (Schönfeld & Wojtczak, 2016), et les acides gras à chaînes moyennes (MCFA, pour *medium-chain*

fatty acids), longs de 7 à 12 atomes de carbone (Schönfeld & Wojtczak, 2016), beaucoup moins polaires que les LCFA, n'ont pas le même niveau de dépendance à la navette CPT pour leur translocation mitochondriale (Adeva-Andany *et al.*, 2019). Le transport mitochondrial des acyl-CoA à courtes chaînes est totalement indépendant de l'activité de CPT1 et CPT2, suggérant une diffusion simple à travers les membranes mitochondriales (Adeva-Andany *et al.*, 2019). Il a longtemps été admis qu'il en était de même pour les MCFA (Papamandjaris *et al.*, 1998; Schönfeld & Wojtczak, 2016). Ce point de vue a été clairement nuancé à la lumière d'une récente étude ayant démontré que, dans un modèle cellulaire neuronal, la β -oxydation de l'acide décanoïque (C10) était presque totalement tributaire de l'activité des CPT, tandis que seulement 44% de la β -oxydation de l'acide octanoïque (C8) était tributaire de CPT1 (Khabbush *et al.*, 2017).

En résumé, il est aujourd'hui considéré que la diffusion, à travers les membranes mitochondriales, des acyl-CoA à chaînes longues est strictement dépendante des perméases CPT, celle des acyl-CoA à chaînes moyennes ne l'est que partiellement, et que celle des acyl-CoA courts en est totalement indépendante. Cette distinction fondamentale sera d'une grande importance, plus bas dans cette thèse.

Au sein de la matrice mitochondriale, se déroule alors l'oxydation proprement dite de la chaîne d'acyl-CoA grâce à quatre réactions successives catalysées, respectivement, par l'acyl-CoA déshydrogénase, la 2-énoyl-CoA hydratase, la L-3-hydroxy-acyl-CoA déshydrogénase puis la 3-ketoacyl-CoA thiolase. Ces quatre réactions permettent, globalement, de produire une chaîne d'acyl-CoA de deux atomes de carbone et de l'acétyl-CoA à deux carbones, complétant un cycle d'oxydation. L'acyl-CoA raccourci subit ce cycle de manière répétée, et ce autant de fois que nécessaire pour la dégradation complète de la chaîne d'acyl-CoA en acétyl-CoA. Une schématisation de la voie complexe de la β-oxydation est schématisée en figure 1.9.

Dans le détail, l'acyl-CoA déshydrogénase commence par oxyder l'acyl-CoA en 2-Enoyl-CoA, par l'insertion d'une double liaison covalente entre les carbones α et β (d'où le nom de la β -oxydation). Les deux électrons libérés lors de cette première étape

d'oxydation sont captés par les flavoprotéines de transfert d'électrons (dont le groupement prosthétique FAD est réduit en FADH₂) qui les transfèrent à leur tour à l'ubiquinone de la chaîne mitochondriale de transfert des électrons. Ensuite, la 2-énoyl-CoA hydratase convertit le 2-Enoyl-CoA en 3-hydroxyacyl-CoA dont l'oxydation subséquente en 3-ketoacyl-CoA par la L-3-hydroxy-acyl-CoA déshydrogénase libère à nouveau un électron. Ce dernier permet de régénérer du NADH à partir de NAD⁺. Le NADH transfert à son tour un électron au complexe I de la chaîne mitochondriale de transport électronique. Pour clore le cycle, l'enzyme 3-Ketoacyl-CoA thiolase hydrolyse le 3-ketoacyl-CoA en une molécule d'acétyl-CoA et un acyl-CoA raccourci de deux carbones. L'acétyl-CoA généré à cette étape peut ensuite être oxydé par le cycle de Krebs. La synthèse d'ATP découlant de la β-oxydation se fait donc grâce aux cofacteurs FADH₂ et NADH réduits aux étapes 1 et 3 mais aussi grâce à l'oxydation de l'acétyl-CoA généré à l'étape 4. Au moment où l'acétyl-CoA intègre le cycle de Krebs, la molécule est scindée par l'action de la citrate synthase qui libère le groupement CoA. Ce dernier, baignant librement dans la matrice mitochondriale, est capté et transloqué par le couple CACT/CPT2 susmentionné pour permettre le transfert de nouveaux acyl-CoA depuis l'espace intermembranaire vers la matrice intracellulaire. Une schématisation générale de la voie de la β-oxydation mitochondriale est illustrée par la figure 1.9.



Figure 1.9 : Transfert mitochondrial de l'acyl-CoA puis déroulement de la voie mitochondriale de la β-oxydation. Au sein de la matrice mitochondriale, l'acyl-CoA, ayant été transféré par le système CPT, subit le cycle β -oxydatif où il est raccourci de deux carbones pour générer de l'acétyl-CoA. L'acyl-CoA raccourci subit le cycle βoxydatif à plusieurs reprises jusqu'à ce que les produits obtenus soient deux molécules d'acétyl-CoA. Les réactions catalysées par l'acyl-CoA dehydrogenase et la 3hydroxyacyl-CoA dehydrogenase libèrent des électrons qui sont transférés, par l'intermédiaire du couple ETF:QO et du complexe I mitochondrial, respectivement, vers l'ubiquinone de la membrane interne mitochondriale, pour alimenter le processus de phosphorylation oxydative non schématisé ici. ATP (adénosine triphosphate); AMP (adénosine monophosphate); CoA (coenzyme A); UQ_{ox} (ubiquinone oxydée); UQ_{red} (ubiquinone réduite) ; ETF:QO (electrontransfer flavoprotein-ubiquinone oxidoreductase); ETF (electron transfer flavoprotein); NAD (nicotinamide adenine dinucleotide); NADH (NAD réduite). Figure modifiée (Bartlett & Eaton, 2004).

Les enzymes, nécessaires à l'exécution de chaque étape de l'oxydation d'un acyl-CoA, existent sous plusieurs formes, chacune se caractérisant par une gamme spécifique de substrat. En effet, l'activité initiale de type acyl-CoA déshydrogénase peut être catalysée par la short-chain acyl-CoA dehydrogenase (SCAD), ayant une affinité pour les acyl-CoA longs de 4 à 6 atomes de carbone, la medium-chain acyl-CoA dehydrogenase (MCAD), ayant une affinité pour les acyl-CoA de 4 à 12 carbones, la long-chain acyl-CoA dehydrogenase (LCAD), ayant une affinité pour les acyl-CoA de 8 à 20 carbones et en particulier les formes monoinsaturées (les acides gras monoinsaturés sont, du reste, les principaux composants des TG), et la very-long-chain acyl-CoA dehydrogenase, ayant une affinité pour 12 à 24 carbones. Quant aux trois dernières étapes de la β-oxydation, dans le cas des acyl-CoA à chaînes longues (longs de 10 à 16 carbones), elles sont catalysées par une seule et même protéine de la membrane interne mitochondriale, la trifunctional protein (MTP) qui possède à la fois les fonctions hydratase, déshydrogénase et thiolase requises (Carpenter et al., 1992; Kamijo et al., 1994; Rector et al., 2008). Pour les acyl-CoA à courtes chaînes, les trois dernières étapes sont respectivement catalysées par la short-chain 2,3-enoyl-CoA hydratase (SCEH), la short-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase (SCHAD) puis la short-chain 3-ketoacyl-CoA thiolase (SKAT). Quant aux acyl-CoA à chaînes moyennes, ils servent également de substrat à la SCEH et à la SCHAD (dont les gammes des substrats ne se limitent pas aux acyl-CoA à courtes chaînes contrairement à ce que pourrait suggérer leur nomenclature) pour les étapes 2 et 3, respectivement, mais ils sont spécifiquement hydrolysés par la medium- chain 3-ketoacyl-CoA thiolase (MKAT) lors de la dernière étape.

1.5.2.2 L'oxydation peroxysomale des lipides

La β -oxydation intervient également, dans une bien moindre mesure, au sein des peroxysomes où elle permet aussi de raccourcir les chaînes d'acyl-CoA entre les carbones α et β . Tous les lipides qui subissent la β -oxydation mitochondriale peuvent aussi subir la β -oxydation peroxysomale. Mais, à la différence de la voie mitochondriale, la β -oxydation peroxysomale a aussi pour substrats les acides gras à très longues chaînes (VLCFA, dépassant une longueur de 18 atomes de carbone), les acides gras dicarboxyliques, les dérivés métaboliques des acides gras polyinsaturés, comme les leucotriènes et les prostaglandines, ou encore certains xénobiotiques qu'elle contribue à détoxifier. La β -oxydation peroxysomale ne permet pas de générer de l'ATP. Elle a pour finalité de raccourcir ces composés, aux longues chaînes aliphatiques peu solubles et donc potentiellement lipotoxiques et pro-inflammatoires, en acyl-CoA à courtes ou moyennes chaînes, voire en acétyl-CoA qui, eux, peuvent être libérés dans le cytosol puis internalisés par la mitochondrie en vue de subir la β -oxydation.

Comme la β -oxydation mitochondriale, un cycle β -oxydatif peroxysomal voit se succéder l'étape initiale de déshydrogénation des carbones α et β , la seconde étape d'hydratation de l'énoyl-CoA, la troisième étape de déshydrogénation 3-hydroxyacyl-CoA déshydrogenase, puis la quatrième étape de thiolyse (Haataja *et al.*, 2011; Poirier *et al.*, 2006b). La β -oxydation peroxysomale se distingue par quelques spécificités. D'abord, la conversion de l'acétyl-CoA en 2-énoyl-CoA y est catalysée par l'enzyme *acyl-CoA oxidase* (homologue de l'acétyl-CoA déshydrogénase mitochondriale) dont le groupement FADH transfert directement ses électrons à l'oxygène, pour générer du H₂O₂. Les deux étapes subséquentes, catalysées par les *peroxisomal multifunctional enzyme* de type 1 et 2 homologues de la MTP mitochondriale, aboutissent à la production de NADH et du 3-kétoacyl-CoA (Haataja *et al.*, 2011; Poirier *et al.*, 2006b) qui est finalement dégradé par la 3-kétoacyl-CoA thiolase pour générer de l'acétyl-CoA et des acyl-CoA à chaînes courtes et moyennes. Finalement, les deux perméases *carnitine acetyltransferase* et *carnitine octanoyltransferase* transfèrent du péroxysome vers le cytosol l'acétyl-CoA et les acyl-CoA raccourcis.

1.5.2.3 L'oxydation microsomale des lipides

L'oxydation microsomale des lipides se déroule dans le réticulum endoplasmique et elle est surtout active dans le foie, les poumons et les reins, en cohérence avec son rôle

déterminant dans la détoxification des métabolites et des xénobiotiques (Cederbaum, 2015; Lu & Coon, 1968; Misra et al., 2013; Wanders et al., 2011). Cette voie catabolique n'est que très indirectement impliquée dans la production d'ATP. Contribuant faiblement à l'oxydation totale des lipides, l'oxydation microsomale des lipides est plus communément appelée ω -oxydation. Les substrats préférentiels de l' ω oxydation sont les VLCFA libres comme l'acide arachidonique, les LCFA saturés ou monoinsaturés libres, et les xénobiotiques lipophiles (Cederbaum, 2015; Lu & Coon, 1968; Misra et al., 2013; Wanders et al., 2011). La voie de l'ω-oxydation s'effectue en trois étapes catalysées par le Cytochrome P450 Family 4 Subfamily A Member (CYP4A), l'alcool déshydrogénase, et l'aldéhyde déshydrogénase. D'ailleurs, c'est par cette voie que le métabolisme physiologique et physiopathologique de l'alcool se retrouve à l'intersection du catabolisme et de l'anabolisme des lipides (Lounis et al., 2016). L'enzyme CYP4A mobilise une molécule de NADH et de l'oxygène pour incorporer un groupe hydroxyle (-OH) à la place d'un des trois hydrogènes liés au carbone ω (le dernier carbone d'une chaîne lipidique). Cela produit un ω -hydroxy-acide. Ce dernier est ensuite oxydé par l'alcool déshydrogénase en ω-aldo-acide dans une réaction qui régénère une molécule de NADH. À ce stade, le carbone ω a une fonction aldéhyde. Enfin, l'ω-aldo-acide est converti par l'aldéhyde déshydrogénase en un acide gras dicarboxylique (dont les carbones Δ et ω correspondent tous les deux à des fonctions acides carboxyliques), dans une réaction qui régénère aussi une molécule de NADH. Les acides dicarboxyliques, une fois activés par l'ACSL, rejoignent les péroxysomes pour subir la β-oxydation peroxysomale (Cederbaum, 2015; Lu & Coon, 1968; Misra et al., 2013; Wanders et al., 2011).



Figure 1.10 : Interconnexion des principales voies d'oxydation des lipides. Dans les hépatocytes où toutes les voies oxydatives des lipides sont actives, les acides gras à très longues chaînes (supérieurs à 20 atomes de carbone) sont dirigés vers la voie microsomale où ils subissent l' ω -oxydation pour être transformés en acides gras dicarboxyliques. Les acides dicarboxyliques et les acyl-CoA à très longues et à longues chaînes (entre 12 et 18 atomes de carbone) subissent un raccourcissement de chaînes au terme de la β -oxydation peroxysomale. Les acyl-CoA à chaînes longues, moyennes et courtes subissent une oxydation complète par la β -oxydation mitochondriale. Le facteur de transcription PPAR α stimule l'expression de plusieurs gènes impliqués dans les trois voies oxydatives lipidiques. VLCFA (*very long chain fatty acids*) ; FACS (*fatty acyl-CoA synthase*) ; PPAR α (*Peroxisome proliferator-activated receptor alpha*) ; CYP4A (*Cytochrome P450 Family 4 Subfamily A Member*) ; C (carbone). (Misra *et al.*, 2013).

1.5.3 La voie de la lipophagie

La lipophagie est une composante de l'autophagie. L'autophagie est un processus hautement conservé qui permet à la cellule de dégrader les éléments sénescents et obsolètes parmi les organelles, les protéines et les métabolites qui la constituent, en les déchargeant dans un lysosome, notamment en vue de les recycler ou d'en extraire de l'énergie chimique (Yin *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2018). Dans un contexte de privation nutritive, l'autophagie est fortement induite. Elle permet alors à la cellule de dégrader

spécifiquement certains de ses constituants en vue de recycler les métabolites vitaux comme les lipides ou les protéines, et de se réapprovisionner en intrants pour ses voies cataboliques génératrices d'ATP (Yin *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2018). L'autophagie se décline en trois catégories, soit la microautophagie (marginale et non pertinente ici), la macroautophagie (la plus courante, dite autophagie de masse, pour sa capacité à recycler plusieurs organelles à la fois) et l'autophagie avec médiation de protéines chaperonnes (CMA, pour *chaperon-mediated autophagy*) ciblant des protéines ou des organelles en particulier (Gual *et al.*, 2017). Les trois voies de l'autophagie sont schématisées dans la figure 1.11.

En bref, durant la CMA, des polypeptides partiellement dénaturés (car obsolètes) ou mal repliés arborent en général la séquence consensus KFERQ (ou, à défaut, une séquence de type KFERQ) reconnue par la protéine chaperonnes de type *cytoplasmic* 70-kDa heat shock protein family (Hsc70). Celle-ci est chargée de dénaturer ces peptides défaillants puis de les diriger, ainsi que toute structure qui leur est physiquement associée, vers la *lysosome-associated membrane protein type-2A* (LAMP-2A) qui assure leur translocation dans la lumière lysosomale où ils seront dégradés par les hydrolases acides (Arias & Cuervo, 2011; Gual *et al.*, 2017).

La macroautophagie est plus complexe et elle se déroule en deux phases (Tanida, 2011; Tanida *et al.*, 2008). Durant la première phase, il émerge du réticulum endoplasmique une boucle membranaire non refermée appelée omégasome qui, à mesure qu'elle grandit accentue sa concavité pour se transformer en phagophore apte à englober les organelles environnantes, puis en autophagosome. Durant sa maturation en autophagosome, le phagophore s'enrichit graduellement en protéine LC3-II apte à recruter la protéine p62 qui sert d'adaptateur entre les peptides ubiquitinés (retrouvés notamment dans les organelles sénescentes) et la LC3-II. C'est ainsi qu'un autophagosome mâture se referme autour de son cargo voué à être dégradé. Durant la deuxième phase de la macroautophagie, l'autophagosome fusionne avec un lysosome pour former une structure hybride appelée l'autolysosome. Les différentes hydrolases acides lysosomales, soit les lipases, les protéases, les nucléases et les glycosides hydrolases se chargent de dégrader le chargement autolysosomal (Tanida, 2011; Tanida *et al.*, 2008). La régulation de l'autophagie est un processus beaucoup trop complexe (Noda, 2017; Tanida, 2011; Yin *et al.*, 2016) pour qu'il soit abordé ici de manière exhaustive. Mais en bref, il convient d'en rappeler le plus important, à savoir que le complexe mTORC1 est le principal répresseur de l'autophagie. Lorsqu'il est activé *via* la voie de signalisation PI3K/AKT, les acides aminés intracellulaires, ou un bilan énergétique positif (ratio ATP :ADP/AMP élevé), le complexe mTORC1 inhibe par hyperphosphorylation directe l'*autophagy related protein 13* et la *UNC-51-like kinase l* (ULK1), les deux protéines qui initient les étapes précoces de la première phase de l'autophagie.



Figure 1.11 : Récapitulatif des trois voies de l'autophagie. Durant le processus de macroautophagie, un phagophore à double membrane phospholipidique se forme et

s'enrichit progressivement en protéine LC3 qui interagit avec la protéine p62. Cette dernière est aussi associée à des organelles défectueuses, ce qui permet d'adapter ces organelles au phagophore. Au terme de la maturation de ce dernier, les complexes organelles:p62:LC3 sont contenus dans l'autophagosome dont la fusion avec un lysosome les expose aux hydrolases acides. Au cours de l'autophagie avec médiation de protéines chaperons, les protéines arborant une séquence de type KFERQ sont liées à la Hsc70 qui sert d'adaptateur à la protéine lysosomale LAMP2A. Les protéines sont ensuite internalisées dans le lysosome puis dégradées par les hydrolases acides. La microautophagie est un processus durant lequel les lysosomes invaginent leurs membranes pour internaliser des protéines cytosoliques à proximité, sans médiation des protéines chaperons. LC3 (microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3); p62 (p62/SQSTM1) ; KFERQ (séquence d'acides aminés de type : Lysinephénylalanine-glutamate-arginine-glutamine) ; LAMP2A (lysosome-associated membrane protein type 2A); Hsc70 (cytoplasmic 70-kDa heat shock protein family). (Gual et al., 2017).

La lipophagie, dont le déroulement est illustré en figure 1.12, est une combinaison fascinante de CMA et de macroautophagie. Elle aboutit à l'hydrolyse des triglycérides et des esters de stérols contenus dans les gouttelettes lipidiques, par la lipolyse acide (Jaishy & Abel, 2016). Plus exactement, durant ce processus, ce sont précisément les périlipines 2 et 3 (PLIN2/3), dont il est formellement démontré qu'elles possèdent des motifs de type KFERQ, qui sont d'abord dégradées par la CMA (Kaushik & Cuervo, 2015), dénudant ainsi les gouttelettes lipidiques. La suppression du couple PLIN2/3 est associée à l'activation de la GTPase RAB7 à la surface des gouttelettes lipidiques, par un mécanisme encore inconnu (Jaishy & Abel, 2016). Une fois activée, RAB7 interagit physiquement avec les protéines clefs de l'autophagie, p62 et LC3-II, ce qui permet aux gouttelettes lipidiques d'être englobées par les autophagosomes en maturation, dans une dynamique de macroautophagie (Jaishy & Abel, 2016; Schroeder et al., 2015). Les gouttelettes lipidiques peuvent être sélectivement (soit en partie, soit totalement) englobées par les autophagosomes, de même qu'elles peuvent être englobées simultanément avec d'autres organelles dans un processus moins sélectif. Dans tous les cas de figures, l'autophagosome finit par fusionner avec un lysosome, dont les hydrolases acides, parmi lesquelles figure la lipase acide lysosomale (LAL), en

dégradent le contenu (Jaishy & Abel, 2016; Schroeder *et al.*, 2015). C'est donc à ce niveau que la LAL catalyse la lipolyse acide, libérant du glycérol et des acides gras libres. Les acides gras libres provenant de la lipophagie sont ensuite essentiellement β oxydés pour régénérer de l'ATP (Heaton & Randall, 2010; Sinha *et al.*, 2014). Contrairement à la lipolyse neutre qui est documentée depuis plusieurs décennies, la lipolyse par lipophagie fait l'objet de recherche moins abondante. Cependant, son importance dans l'homéostasie des lipides n'en est pas moins cruciale comme en attestent les profonds bouleversements du métabolisme des lipides (accumulation des gouttelettes lipidiques, chute de la β -oxydation, remodelage du phospholipidome, inhibition de la voie PI3K/AKT, accumulation toxique de cholestérol libre) résultant de la modulation de la lipophagie (Wang *et al.*, 2019) et de l'autophagie plus globalement (Lin *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2017).



Figure 1.12 : Dégradation des gouttelettes lipidiques par lipophagie. À la suite de l'élimination des PLIN par la CMA, la protéine Rab7 d'une gouttelette lipidique est activée. Rab7 interagit alors avec le complexe p62:LC3-II permettant l'enfermement sélectif d'une partie de la gouttelette (A) ou de la gouttelette entière (B) par un autophagosome, ou encore l'incorporation de la gouttelette dans un processus de

macroautophagie de masse (C), en vue d'une dégradation des triglycérides et des esters de cholestérol par lipolyse acide. Au terme de la lipolyse acide autolysosomale, des acides gras libres et des groupements glycérols sont libérés. TG (triglycérides) ; CE (esters de cholestérol) ; CMA (*chaperon-mediated autophagy*) ; PLIN2&3 (*perilipins 1&3*) ; LC3-II (*microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3-II*) ; p62 (*p62/SQSTM1*) ; FFA (*free fatty acids*). (Jaishy & Abel, 2016).

Bien qu'il soit clairement établi que le jeûne prolongé, de même que l'activation des récepteurs β -adrénergiques, soient d'efficaces inducteurs de la lipophagie, les mécanismes moléculaires précis qui régulent la lipophagie sont encore mal connus (Jaishy & Abel, 2016). Pour l'instant, il est suggéré que le facteur de transcription EB, le facteur PPAR- α , mais aussi le *PPAR-\gamma coactivator 1a* (PGC1 α), ou encore FOXO1, médieraient l'expression et l'activation de la lipase lysosomale acide en réponse au jeûne, tandis que l'activation du *farnesoid X receptor* (FXR) par la diète inhiberait l'activité pro-autophagique et pro-lipophagique du facteur de transcription EB (Jaishy & Abel, 2016). De plus, il est démontré que l'induction de la lipophagie, que ce soit par la déprivation nutritionnelle ou l'activation des voies β -adrénergique, est clairement dépendante de l'activité de RAB7 (Lizaso *et al.*, 2013; Schroeder *et al.*, 2015).

1.5.4 L'acétyl-CoA, la monnaie d'échange énergétique des cellules

1.5.4.1 La production d'énergie chimique utile sous forme d'ATP

L'acétyl-CoA issu de l'oxydation des lipides et des glucides est le métabolite pivot de la conversion de l'énergie chimique des nutriments en ATP (figure 1.13). Toutes les voies du catabolisme des lipides, nous l'avons vu, y débouchent, et toutes les voies de l'anabolisme des lipides en découlent. Dans un contexte catabolique, une molécule d'acétyl-CoA mitochondriale subit les 8 étapes du cycle de Krebs pour être complètement oxydée (Akram, 2014). Un seul tour du cycle de Krebs permet de générer une molécule d'ATP ainsi que du pouvoir réducteur sous la forme de trois molécules de NADH et d'une molécule de FADH₂. À leur tour, chaque molécule de
NADH transmet son électron hautement énergétique à la NADH-déshydrogénase (Complexe I mitochondrial), et chaque molécule de FADH₂ transmet ses deux électrons, légèrement moins énergétiques, à la succinate déshydrogénase (Complexe II mitochondrial). Ainsi est alimentée la chaîne de transport électronique de la membrane interne mitochondriale, où les électrons sont transférés vers des accepteurs électroniques de plus en plus électronégatifs, jusqu'à l'accepteur final, l'oxygène (Papa *et al.*, 2012). En bref, durant ce processus, les électrons passent du complexes I et II à l'ubiquinone, puis au complexe III, au cytochrome C, au complexe IV et enfin à l'oxygène qu'ils réduisent pour générer du H₂O. Au moment précis où les complexes I, III et IV cèdent leurs électrons, il s'en dégage un niveau d'énergie suffisant pour leur permettre de prélever des protons H⁺ de la matrice mitochondriale pour les transporter contre leur gradient de concentration vers l'espace intermembranaire. Il se crée alors un gradient électrochimique, de part et d'autre de la membrane interne mitochondriale, qui alimente la force protomotrice de l'ATP synthase qui, en servant de canal au reflux des protons H⁺, se dote de l'énergie requise pour catalyser la conversion d'ADP+Pi en

ATP. C'est le mécanisme de « couplage » permettant la synthèse d'ATP par phosphorylation oxydative (OXPHOS) (Papa *et al.*, 2012).



Figure 1.13 : Mécanisme de la synthèse d'ATP par la phosphorylation oxydative mitochondriale. La flèche pointillée représente le parcours des électrons depuis le complexe I mitochondrial jusqu'au complexe IV puis l'accepteur final, le O₂ qui est réduit en H₂O. Fournis par le NADH et le FADH₂ issus du cycle de Krebs notamment. les électrons perdent des niveaux d'énergie à chaque étape du transfert, fournissant aux complexes I, III et IV l'énergie nécessaire pour transloquer les protons H⁺ depuis la matrice mitochondriale vers l'espace intermembranaire. En parallèle, le translocateur de Pi et le translocateur d'adénine nucléotide transportent des groupements phosphates et des molécules d'ADP, respectivement, vers l'espace intermembranaire. Tendant à rétablir l'équilibre chimiosmotique en servant de canal pour le reflux des protons H⁺, le complexe V (l'ATPase) se dote d'une force protomotrice dont elle canalise l'énergie pour catalyser, à l'aide de son domaine catalytique orienté vers la matrice mitochondriale, la phosphorylation de l'ADP en ATP. La stœchiométrie est un estimé. NAD (nicotinamide adenine dinucleotide); NADH (NAD réduite); H⁺ (hydrogène cationique); O (oxygène); ADP (adénosine monophosphate); ATP (adénosine triphosphate); Q (ubiquinone); Pi (groupement phosphate, $H_2PO_4^-$); ADN carrier

(*adenine nucleotide translocator*) ; Cx (complexe) ; cyt c (cytochrome c) ; e⁻ (électron). Figure modifiée à partir de Papa *et al.*, 2012.

Dans un état de jeûne, se sont essentiellement les muscles squelettiques, le muscle cardiaque, le tissu adipeux brun (tous des tissus oxydatifs), ainsi que le foie (dans une moindre mesure) qui recourent à la lipolyse suivie de la β -oxydation pour générer de l'acétyl-CoA. Le tissu adipeux blanc, lui, peut libérer des acides gras en recourant à la lipolyse pour approvisionner les tissus oxydatifs périphériques, mais sa propre activité β -oxydative est négligeable.

Quant au foie, sa capacité à oxyder son propre pool d'acétyl-CoA pour la synthèse d'ATP est très limitée, car il en convertit la majeure partie en corps cétoniques. Cela est d'autant plus le cas en période de jeûne, d'hypoglycémie prolongée, où lorsque la diète est appauvrie en glucides et hautement enrichie en lipides (réduisant drastiquement la capacité des tissus périphériques à générer de l'acétyl-CoA par la glycolyse et provoquant une accumulation d'acides gras libres dans le foie), comme sous une diète justement qualifiée de « cétogène » (Barnett & Barnett, 2003; Bartlett & Eaton, 2004). La voie métabolique mitochondriale, exclusivement hépatique, qui convertit l'acétyl-CoA en corps cétonique, est la cétogenèse. En bref, au cours de la cétogenèse, deux molécules d'acétyl-CoA sont liées par l'acétoacyl-CoA thiolase en acétoacyl-CoA. Cette dernière, par l'action successive de la HMG-CoA synthase et de la HMG-CoA lyase, est convertie en acétoacétate qui peut soit générer de l'acétone par décarboxylation spontanée, soit être réduit, dans une réaction réversible, en 3hydroxybutyrate par la 3-hydroxybutyrate déshydrogénase. L'acétoacétate, l'acétone et le 3-hydroxybutyrate sont les principaux corps cétoniques endogènes. Le foie ne possédant pas la capacité de les oxyder, les corps cétoniques diffusent vers la circulation sanguine qui les achemine vers les muscles squelettiques, le cœur, les reins et le système nerveux, où ils sont rétroconvertis en acétyl-CoA par la voie de la cétolyse, en vue de générer de l'ATP. Ainsi les corps cétoniques hépatiques, issus essentiellement de la β -oxydation mitochondriale, représentent au besoin une alternative au glucose pour pourvoir les tissus hautement oxydatifs en acétyl-CoA (Barnett & Barnett, 2003; Bartlett & Eaton, 2004).



Figure 1.14 : Voies cataboliques privilégiées selon les tissus chez les mammifères. Le tissu adipeux blanc fournit aux tissus périphériques des acides gras libres en activant préférentiellement la lipolyse. Les acides gras libres sont essentiellement oxydés par les muscles les reins et le foie. Dans le foie, l'acétyl-CoA générée par l'oxydation des acides gras n'est que partiellement converti en ATP, le reste étant converti en corps cétoniques. Ces derniers sont essentiellement catabolisés par le système nerveux central et par les muscles et les reins dans une moindre mesure. Le glucose, issu en partie de la gluconéogenèse hépatique à partir de composés non glucidiques, sert aussi

de métabolite préférentiel pour le système nerveux central, en concurrence avec les corps cétoniques. (Bartlett & Eaton, 2004).

1.5.4.2 La thermogenèse, ou la dissipation de l'énergie chimique sous forme de chaleur

La conversion de l'énergie chimique des aliments en ATP, au niveau mitochondrial, n'est pas un processus parfait. Comme tout processus thermodynamique, la conversion de l'énergie potentielle, ici sous forme de gradient électrochimique, en énergie utile, l'ATP en l'occurrence, implique inévitablement une perte partielle d'énergie par entropie. Plus exactement, 20 à 30% de l'énergie du gradient électrochimique mitochondrial n'est pas couplée à une synthèse d'ATP, mais se dissipe sous forme de chaleur. Ce phénomène, appelé « découplage » (en opposition au phénomène de couplage susmentionné), aussi connu sous la désignation anglophone de *proton leak*, est expliqué par le fait qu'une partie des protons regagnent la matrice mitochondriale en contournant l'ATPase. Certains des protons regagnant la matrice mitochondriale y parviennent lorsque les phospholipides de la membrane interne opèrent des mouvements sporadiques de *flip-flop*. En effet, à l'endroit précis de la membrane où a lieu le flip-flop, l'imperméabilité aux protons est momentanément (le temps du flipflop) réduite, permettant à quelques protons de regagner la matrice mitochondriale (Jezek et al., 2018). Mais, tel qu'illustré en figure 1.15, la part la plus significative du reflux thermogène de protons indépendant de l'ATPase est assurée par la famille des protéines découplantes (UCP, pour uncoupling proteins) (Valle et al., 2010) présente dans toutes les cellules métaboliques (Donadelli et al., 2014).



Figure 1.15 : La thermogenèse par l'action d'une protéine découplante mitochondriale. Après l'établissement d'un gradient électrochimique par la chaîne mitochondriale de transport des électrons, une partie des protons H+ retourne vers la matrice mitochondriale par l'intermédiaire de UCP, et en contournant l'ATPase. L'énergie utile (ATP) ainsi perdue est dissipée sous forme d'énergie thermique. Une thermogenèse accrue a donc pour cause de réduire la formation d'ATP (flèche inhibitrice bleue). Figure modifiée à partir de Valle et al., 2010.

Les différents isoformes d'UCP sont chacun codés par leurs propres gènes, tous issus d'un seul gène ancestral codant pour un isoforme dont UCP4 serait le plus proche (Ledesma *et al.*, 2002). L'isoforme UCP1 est abondamment exprimé dans les tissus adipeux brun et beige, UCP2 est exprimé dans le foie, le pancréas, le tissu adipeux blanc, le système nerveux central, les reins et les cellules immunitaires, UCP3 dans les muscles et les tissus adipeux blanc et brun, et UCP4 et 5 dans le système nerveux central estimulations que dans une moindre mesure. Structurellement, les isoformes d'UCP sont très similaires, avec un poids moléculaire compris entre 31 à 38 kDa, et une structure polypeptidique tripartite où chaque partie possède deux hélices alpha (lipophiles). Sous leur forme repliée, les isoformes UCP se présentent donc comme des protéines avec 6 domaines transmembranaires traversant

la membrane mitochondriale interne, reliés entre eux par de longues boucles hydrophiles orientées vers la matrice mitochondriale (Ledesma *et al.*, 2002).

D'un point de vue fonctionnel, les protéines UCP sont décrites comme des transporteurs à protons H^+ et aussi à petits et gros anions comme le Cl⁻ et les acides gras anioniques (Donadelli et al., 2014; Jezek et al., 2018), mais leur mécanisme d'action est plus complexe et plus finement régulé que celui de simples canaux ouverts. Parmi plusieurs modèles proposés ces deux dernières décennies, deux, qui ne sont pas forcément mutuellement exclusifs, sont aujourd'hui proposés pour expliquer l'activation des protéines UCP : Le modèle de « rotation des acides gras (fatty acids cycling) » et le modèle de « la navette acides gras » (Jezek et al., 2018). Ces deux modèles mécanistiques (illustrés en figure 1.16) ont été majoritairement explorés pour les isoformes UCP1 et UCP2, et leur extrapolation vers les autres isoformes n'est que spéculative. Selon le premier modèle, les acides gras anioniques (dont le groupement acide carboxylique a cédé un proton H⁺ en solution) du feuillet interne (matriciel) de la membrane interne mitochondriale diffusent librement jusqu'à ce qu'ils interagissent physiquement avec les résidus Arg60 et Lys271 des domaines transmembranaires d'une protéine UCP. À ce niveau, sous l'effet du potentiel de membrane de la membrane interne mitochondriale, et en suivant un parcours tracé par des résidus basiques le long du domaine transmembranaire d'UCP, les acides gras anioniques migrent vers le feuillet externe de la membrane interne mitochondriale, puis se dissocient de la protéine avant de s'en éloigner par diffusion latérale et être à nouveau protonés (par liaison d'un nouveau proton H⁺ en abondance dans l'espace intermembranaire). L'acide gras protoné se transloque ensuite, par un mouvement spontané de *flip-flop*, dans le sens du gradient électrochimique protonique, vers le feuillet interne de la membrane interne mitochondriale où il est déprotoné en libérant son cation H⁺, refermant ainsi le cycle. Cela résulte donc, pour chaque acide gras anionique transporté par UCP, en une récupération nette d'un proton H⁺ par la matrice mitochondriale. Le second modèle suggère que le canal au cœur de la protéine UCP héberge un acide gras qui sert de navette aux protons H⁺. En bref, ce modèle propose qu'UCP agirait comme une sorte de perméase qui, lorsqu'elle s'associe à un acide gras protoné issu de l'espace intermembranaire et/ou du feuillet externe de la membrane interne mitochondriale, séquestre puis réoriente la tête carboxylique de cet acide gras vers la matrice mitochondriale où il est déprotoné, permettant ainsi le transport net d'un proton H⁺ vers la matrice. L'acide gras anionique serait ensuite réorienté par UCP en direction de l'espace intermembranaire où il serait protoné à nouveau, répétant le cycle de la navette. Les deux modèles, schématisés en figure 1.16, ont en commun de faire intervenir les acides gras libres de la membrane interne mitochondriale comme les effecteurs clefs de la fonction découplante des protéines UCP (Jezek *et al.*, 2018).



Figure 1.16 : Mécanismes d'action des protéines UCP selon les modèles de « rotation des acides gras » et de « la navette acides gras ». Le modèle de rotation des acides gras (A) suggère que les acides gras anioniques du feuillet interne de la MIM interagissent avec les résidus (représentés par le symbole +) Arg60 et Lys271 d'UCP avant que cette dernière ne les transfert vers le feuillet externe de la membrane interne mitochondriale où ils captent un proton H⁺ de l'espace intermembranaire. Les acides gras cationiques s'éloignent d'UCP par diffusion simple puis suivent un mouvement de *flip-flop* vers le feuillet interne de la membrane interne mitochondriale avant de céder leur proton H⁺ à la matrice, une nouvelle fois. Les nouveaux acides gras

anioniques répètent alors le cycle. Le modèle de la navette, plus simple, suggère qu'un acide gras prisonnier du canal d'UCP change continuellement d'orientation, cédant son proton H+ à la matrice lorsqu'il est orienté vers celle-ci, puis liant un nouveau proton H⁺ lorsqu'il est orienté vers l'espace intermembranaire. UCP (*uncoupling protein*); FA (*fatty acid*). (Jezek *et al.*, 2018).

L'efficacité des acides gras libres à stimuler l'activité découplante de UCP est d'autant plus élevée qu'ils possèdent des insaturations dans leurs chaînes aliphatiques (Beck *et al.*, 2007; Donadelli *et al.*, 2014). Plus exactement, sur le critère de leur capacité à activer UCP1 et UCP2, les acides gras ont été hiérarchisés par Beck *et al.* (2007) comme suit : acide palmitique (saturé) < acide oléique (monoinsaturé) < acide eicosatriénoïque (un ω -9 à trois insaturations) < linoléique (un ω -2 à deux insaturations) < acide rétinoïque (dont la queue aliphatique possède quatre insaturations) < acide arachidonique (un ω -6 à quatre insaturations).

La part d'énergie découplée par l'action des protéines UCP alimente la thermogenèse mitochondriale hors activité physique (*non-shivering thermogenesis*), constitutive, permettant aux mitochondries d'atteindre une température avoisinant les 50 degrés Celsius (Chretien *et al.*, 2018). Cette chaleur qui se répand par diffusion et *via* la circulation sanguine, contribue au maintien de la température corporelle.

1.5.5 La thermogenèse hors activité physique au niveau du tissu adipeux brun

Les deux tissus qui possèdent, de très loin, la plus grande activité thermogène par découplage mitochondrial sont le tissu adipeux brun et le tissu adipeux beige (Harms & Seale, 2013).

Le tissu adipeux brun est surtout retrouvé chez les petits mammifères (comme les rongeurs). Chez l'humain, il est abondant aux premières années de la vie avant de régresser à des niveaux résiduels à l'âge adulte. Le tissu adipeux brun joue un rôle essentiel dans le maintien de la température corporelle des mammifères. Le tissu

adipeux brun, chez les rongeurs, se situe dans les régions interscapulaire, axillaire et cervicale, tandis que chez l'humain, il n'est présent que dans la région scapulaire.

Dans l'état actuel des connaissances, il est admis que les adipocytes bruns, unités fonctionnelles du tissu adipeux brun, descendent de précurseurs cellulaires embryonnaires de la masse somitale exprimant l'antigène de différentiation Myf5 typique de la lignée myocytaire squelettique. C'est l'activité du facteur PR/SET Domain 16 (PRDM16) qui dirige la spécialisation des progéniteurs Myf5⁺ en adipocytes bruns plutôt qu'en myocytes squelettiques (Seale et al., 2008). Au niveau structural, comparés à des adipocytes blancs, les adipocytes bruns se caractérisent par un diamètre relativement petit situé entre 10 et 25 microns (le diamètre des adipocytes blancs varie entre 20 et 150 microns). De plus, les adipocytes bruns sont multiloculaires. C'est-à-dire qu'ils renferment de nombreuses petites gouttelettes lipidiques de quelques microns de diamètres, contrairement aux adipocytes blancs qui renferment une seule vacuole lipidique pouvant occuper 90% du volume cellulaire (Stock & Cinti, 2003). Une autre caractéristique singulière des adipocytes bruns est leur très forte densité de mitochondries qui expriment en abondance et de manière constitutive la protéine UCP1 (Stock & Cinti, 2003). D'ailleurs, au niveau fonctionnel, c'est le tissu adipeux brun qui possède la plus forte expression d'UCP1 et donc la plus grande activité thermogène dans l'organisme. La régulation de la thermogénèse par le tissu adipeux brun dépend à la fois de la modulation de l'expression du gène UCP1 et de la modulation de la lipolyse qui fournit les acides gras libres dont l'oxydation alimente le processus thermogène (Seale et al., 2008).

Le tissu adipeux beige, chez les rongeurs, peut émerger au sein des tissus adipeux blancs sous-cutané et viscéral, tandis que chez l'humain, c'est surtout au niveau supraclaviculaire qu'il est retrouvé (Harms & Seale, 2013). Abondamment étudié dans des modèles murins, le tissu adipeux beige ne partage pas du tout d'origine embryonnaire commune avec le tissu adipeux brun. Pouvant se développer même à l'âge adulte, au cours du processus dit de « brunissement du tissu adipeux », le tissu adipeux beige provient essentiellement de préadipocytes blancs différenciés en

adipocytes mâtures qui finissent par partager de nombreux points communs avec les adipocytes bruns, comme la présence de gouttelettes lipidiques multiloculaires, et la forte activité thermogène due à la haute densité en mitochondries enrichies en UCP1 (Harms & Seale, 2013). Il a aussi été suggéré qu'au moins une partie des adipocytes constituant le tissu adipeux beige seraient issus de la transdifférentiation d'adipocytes blancs mâtures à gouttelettes uniloculaires (l'unité fonctionnelle du tissu adipeux blanc) en adipocytes de type brun (Barbatelli *et al.*, 2010; Himms-Hagen *et al.*, 2000). Les tissus adipeux brun et beige possèdent de fortes activités lipolytique et β -oxydative soutenant leur activité thermogène. C'est pour cela qu'ils suscitent un intérêt croissant

soutenant leur activité thermogène. C'est pour cela qu'ils suscitent un intérêt croissant pour la lutte contre les maladies métaboliques comme l'obésité. Cela sera évoqué à nouveau plus bas.

1.5.6 La régulation de la thermogenèse hors activité physique

Le cofacteur maître permettant l'induction de la thermogenèse de tous les types d'adipocytes bruns et beiges est PGC1 α . Lorsqu'il est activé, le cofacteur PGC1 α peut se lier aux PPAR γ et α , mais aussi aux RXR et au récepteur aux hormones stéroïdiennes, pour créer des complexes de transcription stimulant l'expression des gènes clefs de la biogenèse mitochondriale et de la thermogenèse, incluant *UCP1* ainsi que son propre gène (*PPARGC1A*) (Harms & Seale, 2013; Jornayvaz & Shulman, 2010). La stimulation de la biogenèse mitochondriale et de l'expression des protéines thermogènes sont, en effet, les deux signatures caractéristiques de l'adiposité brune et beige. Comme nous le verrons dans ce qui suit immédiatement, tous les processus inducteurs de la thermogenèse sont de près ou de loin associés à l'activité de PGC1 α . L'innervation des tissus adipeux par les fibres sympathiques du système nerveux autonome est une composante importante pour la régulation de la thermogenèse, comme l'illustre la figure 1.17. Les catécholamines libérées par les neurones adrénergiques agissent de manière paracrine sur les adipocytes bruns et beiges en activant leurs récepteurs β -adrénergiques. D'une part, cela active la lipolyse (suivant le

mécanisme dépendant de la PKA décrit dans la section 1.5.1.2) pour libérer des acides gras libres à chaînes longues qui sont pour la plupart des monoinsaturés (car provenant des gouttelettes lipidiques) et donc d'efficaces inducteurs de l'activité découplante de la protéine UCP1 en vertu des modèles de « rotation des acides gras » et de « navette acides gras ». D'autre part, la PKA activée phosphoryle la cAMP response elementbinding protein (CREB) ainsi que la MAP kinase p38, qui activent par phosphorylation PGC1a qui peut alors se complexer avec ses partenaires pour stimuler l'expression du gène UCP1 et des gènes de la biogenèse mitochondriale. En parallèle, l'activation des voies β-adrénergiques augmente les niveaux cellulaires du facteur de transcription C/EBPß en induisant la dégradation, dirigée par le micro-ARN miR-196a, du répresseur de sa transcription, Hoxc8 (Mori et al., 2012). À son tour, C/EBPß se lie au promoteur du gène *PPARGC1A* pour stimuler sa transcription puis augmenter les niveaux de PGC1a (Karamanlidis et al., 2007). La protéine PGC1a, une fois phosphorylée, coactive PPARy, RXR et les récepteurs thyroïdiens en vue de la régulation transcriptionnelle de son propre gène PPARGCIA mais aussi les autres gènes de la thermogenèse. Comme les catécholamines, le peptide natriurétique sécrété par les cardiomyocytes en réponse à une augmentation de la pression sanguine, stimule la thermogenèse via une signalisation presqu'en tout point semblable, avec pour seule différence qu'elle dépend de la GMP cyclique en guise de second messager activant ainsi la PKG, et non la PKA (Kimura et al., 2017).



Figure 1.17 : Activation de la thermogenèse par les catécholamines et le peptide natriurétique. Schématisation des voies de signalisations activées par la norépinéphrine et le peptide natriurétique, et aboutissant, de manière synchronisée, à l'expression des gènes clefs de la thermogenèse et à l'activation de de la lipolyse. L'oxydation mitochondriale des acides gras libres libérés alimente la thermogenèse opérée par UCP1. NE (norépinephrine) ; NP (peptide natriurétique) ; Npra (*natriuretic peptide receptor a*) ; GC (*guanylyl Cyclase*) ; AC (*adnylyl cyclase*) ; AR (*adrenal receptor*) ; cAMP (AMP cyclique) ; cGMP (GMP-cyclique) ; PKA&G (prétines kinases A&G) ; FFA (*free fatty acid*) ; P (groupement phosphate) ; p38 (MAP kinase p38) ; CREB (*cAMP response element-binding protein*) ; Atf2 (*activating transcription factor 2*) ; miR-196a (micro-ARN-196a) ; PGC1a (*Peroxisome proliferator-activated receptor-y coactivator 1a*) ; TFX (transcription factor) ; UCP1 (uncoupling protein 1) ; LCFA (long chain fatty acid) ; Pla2 (phospholipase A2). (Harms et Seale, 2013).

L'exposition prolongée de même que l'exposition courte mais intense au froid, sont des conditions environnementales qui, de manière universelle chez les mammifères incluant l'humain, induit la réponse thermogène des tissus adipeux brun et beige (Ikeda et al., 2018; Ouellet et al., 2012; Shore et al., 2013). Lorsque les thermorécepteurs cutanés et viscéraux sont activés par le froid, ils acheminent des influx inhibiteurs vers le noyau préoptique médial de l'hypothalamus qui lève alors l'inhibition qu'il exerce, via une chaîne complexe de neurones efférents, sur le noyau intermédiolatéral de la moëlle épinière. Le noyau intermédiolatéral est alors en mesure d'envoyer des influx activateurs de la thermogenèse à travers ses projections sympathiques adrénergiques dont les extrémités font synapse avec le tissu adipeux brun, notamment (Morrison et al., 2012). À l'inverse, lorsqu'ils captent une élévation de la température, les thermorécepteurs font parvenir des influx activateurs vers le noyau préoptique médial de l'hypothalamus, empêchant la mobilisation du tissu adipeux brun (Morrison *et al.*, 2012). D'une manière non surprenante, il a récemment été démontré que le brunissement du tissu adipeux blanc en réponse au froid était également dépendent de l'activité du système nerveux sympathique (Cao et al., 2019), laissant suggérer que ce mécanisme activateur reflexe de réponse au froid est commun aux tissus adipeux brun et beige. En complément de ce mécanisme, il a été démontré que les macrophages de polarité M2 résidant dans les tissus adipeux brun et blanc, étaient capables de sécréter eux-mêmes, en réponse au froid, des catécholamines, activant de manière paracrine la lipolyse et la thermogenèse (Nguyen et al., 2011). Les macrophages à polarité M2 sont des macrophages anti-inflammatoires et immunosuppresseurs impliqués dans la réparation tissulaire et la résolution de l'inflammation (da Silva et al., 2015; Sica & Mantovani, 2012).

Plusieurs autres facteurs endogènes activent de manière endocrine ou autocrine l'activité thermogène des tissus adipeux bruns et beige. C'est le cas de l'irisine, une myocytokine sécrétée par le muscle squelettique durant l'activité physique et dont la synthèse est directement activée au niveau transcriptionnel par PGC1α (Bostrom *et al.*, 2012). C'est également le cas du *Fibroblast growth factor 21* (FGF21) qui est sécrété par le tissu adipeux blanc en réponse au froid et qui stimule (sans doute *via* son récepteur β -klotho) de manière autocrine et paracrine le processus de brunissement en augmentant les niveaux protéiques de PGC1 α et d'UCP1 (Fisher *et al.*, 2012). Chez les rongeurs nouveau-nés, l'ingestion du lait maternel (et plus exactement les lipides et les corps cétoniques qu'il fournit) stimule, par un mécanisme dépendant de PPAR α , l'expression et la sécrétion hépatique de FGF21 qui a son tour active de manière endocrine la thermogenèse du tissu adipeux brun (Hondares *et al.*, 2010).

En outre, les agonistes de PPAR γ comme les glitazones (rosi-, pio-, et troglitazone) stimulent aussi le brunissement du tissu adipeux blanc sous-cutané (Ohno *et al.*, 2012; Qiang *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2017a). En effet, en se liant à PPAR γ , ses agonistes provoquent sa désacétylation, ce qui augmente et stabilise son interaction avec PRDM16 (Harms & Seale, 2013; Qiang *et al.*, 2012). Or, tel qu'illustré en figure 1.18, la formation du complexe entre PPAR γ et PRDM16 constitue le principal facteur de transcription permettant le déroulement des stades précoces de la différentiation des préadipocytes bruns en adipocytes bruns mâtures dans le tissu adipeux brun, et de la différentiation des préadipocytes blancs en adipocytes beiges (Harms & Seale, 2013).



Figure 1.18 : Différentiation des adipocytes bruns et des adipocytes beiges. (a) L'adipocyte brun est dérivé d'un progéniteur Myf5⁺ différencié dès l'embryogenèse en préadipocyte brun. Coactivé par Ebf2, PPARy stimule la transcription et renforce l'activité de PRDM16 qui orchestre la différentiation du préadipocyte brun en adipocyte brun mâture (gouttelettes lipidiques multiloculaires et mitochondries abondantes). L'activation de PGC1 α par le froid et/ou les voies β -adrénergiques permet finalement l'activation de la fonction thermogène de l'adipocyte brun (expression d'UCP notamment). (b) La flèche épaisse symbolise la solidité du consensus selon lequel des préadipocytes blancs sous-cutanés, après désacétylation activatrice de PPARy par ses ligands spécifiques (comme le TZD) puis activation canonique de PRDM16 puis de PGC1a, peuvent se différencier en adipocytes beige plutôt qu'en adipocyte blanc. La flèche pointillée souligne la possibilité (moins solide scientifiquement) que les adipocytes blancs soient transdifférenciés en adipocytes beiges, et vice-versa. Au niveau du tissu adipeux blanc épididymaire, les préadipocytes bipotents peuvent suivre deux voies de différenciation. Soit ils se spécialisent en adipocytes blancs mâtures sous l'effet d'une diète riche en gras, soit ils se spécialisent en adipocytes beiges après que PGC1a ait été activé par les mécanismes canoniques induits par le froid et/ou la stimulation β -adrénergique. Figure copiée (Harms & Seale, 2013). Myf5⁺ (encoding myogenic factor 5-expressing); Ebf2 (early B cell factor-2);

PPAR γ (peroxisome proliferator-activated receptor gamma); PRDM16 (*PR-domain containing 16*); PGC1 α (peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha); TZD (thiazolidinediones); Ac (groupement acétyl); Sirt1 (sirtuin 1); Pdgfr- α^+ (platelet-derived growth factor receptor- α expressing). (Harms et Seale, 2013).

1.6 La régulation de la balance catabolisme/anabolisme des lipides

La sollicitation des voies cataboliques aux dépend des voies anaboliques, ou l'inverse, est gouvernée par les besoins énergétiques de l'organisme. L'homéostasie du métabolisme des lipides repose sur la capacité des cellules et des organes métaboliques à moduler leurs processus cataboliques et anaboliques en réponse au statut nutritionnel et énergétique de l'organisme. Le maintien de l'homéostasie des lipides fait intervenir plusieurs mécanismes au niveau cellulaire et au niveau physiologique.

1.6.1 L'*AMP-activated kinase* (AMPK), pivot régulateur maître de l'homéostasie du métabolisme des lipides

Au niveau cellulaire, le principal capteur et régulateur du niveau énergétique est la protéine *AMP-activated kinase* (AMPK), une protéine universellement répandue chez les eucaryotes. Cette protéine cytosolique est composée d'une sous-unité catalytique α et de deux sous-unités constituant des domaines allostériques régulateurs, β et γ (Carlson & Kim, 1973; Hardie, 2014; Jäger *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2011). Des ratios cellulaires AMP/ADP : ATP élevés, correspondant à une chute des niveaux d'énergie chimique sous forme d'ATP comme lors d'un jeûne prolongé ou d'une activité physique, entrainent l'activation de l'AMPK par phosphorylation du résidu Thr172 de sa sous-unité α . Plus exactement, la liaison de l'AMP et de l'ADP à la sous-unité γ accroit la sensibilité du résidu Thr172 de la sous-unité α aux kinases LKB1 (active de manière constitutive) et CaMKK β (activée par le Ca²⁺ cytosolique et la calmoduline). De plus, la liaison de l'AMP et de l'ADP à la sous-unité γ induit une modification

conformationnelle qui protège le résidu Thr172 phosphorylé de l'action d'une vaste gamme de phosphatases. De surcroit, cette modification conformationnelle est requise pour que la sous-unité α phosphorylée soit pleinement fonctionnelle. Une fois activée, l'AMPK restaure une balance catabolique en inhibant directement plusieurs voies anaboliques et en activant plusieurs voies cataboliques (Carlson & Kim, 1973; Hardie, 2014; Jäger *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2011).

D'une part, l'AMPK activée inhibe la DNL et la synthèse du cholestérol en inhibant, par phosphorylations directes, l'activité des enzymes ACACA (Davies *et al.*, 1990) et HMG-CoA réductase (Corton *et al.*, 1995), ainsi qu'en inhibant le clivage protéolytique des facteurs de transcription SREBP1c et SREBP2 (Li *et al.*, 2011). La forme activée de l'AMPK entraine aussi l'inhibition de l'activité de l'enzyme GPAT (dont l'expression transcriptionnelle est en outre dépendante de SREBP1c), inhibant la synthèse des triglycérides et des phospholipides (Muoio *et al.*, 1999). Dans le même temps, l'AMPK inhibe la synthèse de glycogène en phosphorylant la glycogène synthase (Jorgensen *et al.*, 2004), et restreint la protéosynthèse en inhibant l'activité du complexe mTORC1 (Xu *et al.*, 2012). D'ailleurs, l'inhibition de mTORC1 permet de lever l'inhibition qu'il exerce *via* ULK1 sur l'autophagie (Rabanal-Ruiz *et al.*, 2017), favorisant ainsi le processus catabolique de lipophagie.

Quant aux effets de l'AMPK sur le catabolisme ils sont tout aussi diversifiés. D'abord, l'AMPK favorise l'oxydation des glucides en favorisant l'internalisation du glucose – en induisant l'expression transcriptionnelle et la translocation membranaire des perméases *Glucose transporters* (GLUT) et *Na⁺-coupled glucose carrier* (SGLT) (Fryer *et al.*, 2002; McGee *et al.*, 2008; Sopjani *et al.*, 2010) – puis en stimulant la glycolyse *via* la phosphorylation directe de l'enzyme 6-phosphofructo-2-kinase (PFK-2) (Marsin *et al.*, 2000; Marsin *et al.*, 2002). En parallèle, l'AMPK activée stimule plusieurs composantes du catabolisme des lipides. Elle optimise l'internalisation des acides gras libres en favorisant l'expression et la translocation membranaire de CD36 (Choi *et al.*, 2017; Habets *et al.*, 2009), puis stimule indirectement leur oxydation. En effet, en inhibant l'activité de l'enzyme ACACA, l'AMPK contribue à réduire les taux

de malonyl-CoA qui est un puissant inhibiteur allostérique de CPT1 (Prentki et al., 2002). L'AMPK stimule ainsi la β -oxydation des lipides. En outre, l'AMPK exerce une action activatrice par phosphorylation directe sur PGC1a qui promeut la biosynthèse mitochondriale et l'expression des protéines UCP (Jager et al., 2007; Suwa et al., 2003). D'ailleurs, le phénomène de découplage mitochondrial diminue les niveaux d'ATP, ce qui participe à activer l'AMPK, créant une boucle auto-activatrice pour la thermogenèse. Un autre effet de l'AMPK, et non des moindres, est son potentiel inducteur de la lipophagie (Kaushik & Cuervo, 2015, 2016). Lorsque les périlipines PLIN2 interagissent avec Hsc70, l'AMPK (lorsqu'activée) catalyserait leur phosphorylation, ce qui faciliterait leur dégradation par la CMA ainsi que l'hydrolyse subséquente de la gouttelette lipidique et de son contenu par macroautophagie et lipolyse acide (Kaushik & Cuervo, 2015, 2016). En revanche, il est intéressant de mentionner que l'AMPK inhibe la lipolyse neutre en inhibant l'activité de l'enzyme ATGL et en entravant la translocation de HSL vers les gouttelettes lipidiques (Daval et al., 2005; Kim et al., 2016), ce qui peut sembler inattendu à première vue étant donné que la lipolyse est une voie catabolique. Pour expliquer cela, Hardie (2014) propose que « si les acides gras libérés lors de la lipolyse ne sont pas rapidement métabolisés ou exportés de la cellule, ils doivent être rétroconvertis en triglycérides dans un processus consommant deux molécules d'ATP par acide gras. L'inhibition de la lipolyse par l'AMPK serait donc un frein pour éviter un flux lipolytique supérieur aux capacités oxydatives de la cellule (Hardie, 2014) », limitant les pertes inutiles d'ATP dans un contexte de stress énergétique.



Figure 1.19 : Le rôle central l'AMPK dans la régulation du métabolisme cellulaire. Enzymes et facteurs de transcription ciblés directement par l'AMPK, et voies métaboliques qu'ils gouvernent. Les flèches rouges symbolisent un effet inhibiteur et les flèches vertes symbolisent un effet activateur. GLUT1&4 (glucose transporters 1&4) ; CD36 (cluster of differentiation 36) ; mTOR (mechanistic target of rapamycin) ; RNA pol I (ARN polymérase I) ; TBC1D1 (*tre-2/USP6, BUB2, cdc16 domain family member 1*) ; PFKFB 3&4 (6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 3&4) ; ACC1&2 (acetyl-CoA carboxylase 1&2) ; PGC1a (Peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator 1a) ; SIRT1 (sirtuine 1) ; ULK1&2 (*UNC-51-like kinase 1&2*) ; SREBP1c (sterol regulatory element-binding protein 1c) ; GPAT (glycérol-3-phosphate acyltranferase) ; HMGR (hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA reductase) ; HDAC (histone deacetylase) ; CRTC2 (*CREB Regulated Transcription Coactivator 2*) ; TSC2 (*Tuberous Sclerosis Complex 2*). (Hardie *et al.*, 2012).

L'AMPK contrôle le métabolisme à l'échelle de l'organisme, aussi, en modulant l'activité de l'hypothalamus qui est un régulateur central de l'homéostasie énergétique. La ghréline qui est une hormone orexigène sécrétée par l'estomac durant le jeûne, l'adiponectine sécrétée par le tissu adipeux blanc des individus métaboliquement sains, et une chute de la concentration circulante de glucose, sont des facteurs qui activent l'AMPK dans l'hypothalamus. À son tour, l'AMPK hypothalamique stimulerait une boucle autoactivatrice en activant les récepteurs Ryanodine (par un mécanisme encore non défini), libérant ainsi du calcium, et activant la CaMKK. Le calcium induit une libération de glutamate qui active les neurones orexigènes NPY/AgRP⁺. L'activation de ces derniers se traduit par plusieurs effets. Ils stimulent le comportement alimentaire, envoient des influx nerveux sympathiques pour induire la libération de norépinéphrine par les neurones adrénergiques et la glande surrénale, et stimulent la glande pituitaire qui sécrètent l'ACTH et de la TSH, respectivement. L'ACTH et la TSH induisent, respectivement, la sécrétion de cortisol par la glande surrénale et la sécrétion des hormones thyroïdiennes T3 et T4 par la glande thyroïde (Hardie, 2014; Yang et al., 2011). Le cortisol et les hormones thyroïdiennes exercent plusieurs effets endocriniens qui consistent à rehausser le statut énergétique de l'organisme. Par exemple, le cortisol va favoriser la hausse de la glycémie. Pour ce faire, le cortisol stimule la gluconéogenèse et inhibe la synthèse de glycogène dans le foie, décroît la captation de glucose par les muscles squelettiques, stimule la lipolyse dans le tissu adipeux blanc, et, au niveau du pancréas, stimule la sécrétion d'insuline tout en inhibant la sécrétion du glucagon (Thau & Sharma, 2020). Quant aux hormones thyroïdiennes, leurs effets sont ubiquitaires. Ces derniers consistent à amplifier le catabolisme des nutriments pour accroître la synthèse d'ATP et la thermogenèse. En bref, les hormones thyroïdiennes stimulent l'expression des gènes mitochondriaux et augmentent la sensibilité des tissus cataboliques (comme le tissu adipeux brun) aux catécholamines, ce qui cause l'intensification des influx sympathiques (Shahid & Sharma, 2020).

De récentes avancées ont permis de mettre en évidence un rôle non négligeable de l'AMPK dans la régulation de la fonction sécrétrice d'insuline des cellules β pancréatiques (Rourke et al., 2018). Ces dernières sont responsables de l'homéostasie glycémique car elles sécrètent des quantités d'insuline appropriées en réponse aux niveaux circulants de glucose et de lipides. L'inactivation de l'axe LKB1-AMPK au niveau des cellules β (naturellement en réponse au catabolisme accru du glucose ou expérimentalement par invalidation génétique de LKB1) résulte, par un mécanisme qui

demeure indéterminé, en une sécrétion accrue de l'insuline en réponse au glucose et en un gain significatif de la « masse des cellules β (β -cell mass) » (Rourke et al., 2018). À son tour, l'insuline sécrétée entraine l'inhibition de l'AMPK au niveau de l'hypothalamus (Hardie, 2014; Yang *et al.*, 2011).

De manière antagoniste, la leptine, le facteur anorexigène *Glucagon-like peptide 1* (GLP1) (Hurtado-Carneiro *et al.*, 2012), et l'hormone T3, entrainent l'inhibition de l'AMPK au niveau hypothalamique, en partie en inhibant les effets de la ghréline. Par contre, la leptine active les influx sympathiques émis par l'hypothalamus ce qui permet l'activation de l'AMPK musculaire (Minokoshi *et al.*, 2002).



Figure 1.20 : Le rôle central de l'AMPK hypothalamique dans la régulation de la balance énergétique de l'organisme. Action de certains facteurs circulants clefs régulateurs du métabolisme, sur l'activité de l'AMPK des neurones de l'hypothalamus, et les effets comportementaux et physiologiques associés. CRH (*Corticotropin-releasing hormone*) ; TRH (*thyrotropin-releasing hormone*) ; T3 (*triiodothyronine*) ; T4 (*thyroxine*) ; TSH (*thyroid stimulating hormone*) ; ACTH (*Adrenocorticotropic hormone*). (Hardie, 2014).

1.6.2 La contribution des *peroxisome proliferator-activated receptors* (PPARs) à l'homéostasie des lipides

1.6.2.1 Une vue d'ensemble des PPARs

Les PPARs constituent une famille de récepteurs intracellulaires aux acides gras, dont les effets sur le métabolisme et le catabolisme des lipides sont divers, complémentaires et parfois même antagonistes, comme il le sera présenté dans ce qui suit (Grygiel-Górniak, 2014; Lee et al., 2003; Viswakarma et al., 2010). Exprimés le plus abondamment dans les tissus adipeux blanc et brun, le foie, les muscles et les cellules endothéliales, ces récepteurs possèdent un domaine d'interaction avec leurs ligands naturels, les lipides, ou leurs ligands artificiels (comme les glitazones susmentionnés), un domaine d'interaction avec soit des coactivateurs soit des répresseurs, et un domaine de liaison à l'ADN. Lorsqu'ils se lient à leur ligand, les PPARs se transloquent vers le noyau, puis se complexent avec le retinoid X receptor (RXR) avant de se fixer sur les peroxisome proliferator response element (PPRE) au niveau des promoteurs de plusieurs gènes impliqués dans les réponses métaboliques. L'association entre PPAR et RXR et l'activité subséquente de PPAR, sont optimisés lorsque RXR est lui aussi lié par son ligand préférentiel, l'acide 9-cis rétinoïque (Liu et al., 2013b). En parallèle, le changement conformationnel que leur appliquent leurs ligands leur permet de se défaire de leurs répresseurs et d'interagir avec leurs coactivateurs qui ont pour fonctions d'acétyler ou de méthyler la chromatine pour réguler l'expression transcriptionnelle

des gènes métaboliques (Grygiel-Górniak, 2014; Lee *et al.*, 2003; Viswakarma *et al.*, 2010).



Figure 1.21 : Régulation de l'activité transcriptionnelle des PPARs. En absence de leurs ligands respectifs, un PPAR et un RXR complexés sont fixés au PPRE, mais leur activité transcriptionnelle est inhibée par un complexe corépresseur constitué de NCoR, SMRT et Sin3 qui recrutent la HDAC. Cette dernière cause la désacétylation des histones de la région promotrice, causant une baisse d'expression du gène qu'elle gouverne. Cette situation est schématisée dans le panneau de gauche. Dans le cas contraire où le PPAR et RXR sont liés par leurs ligands respectifs (représentés par les petits trapèzes jaune et bleu), le complexe PPAR:RXR subit une modification conformationnelle qui le débarrasse du complexe corépresseur et de HDAC, et permet l'assemblage d'un complexe coactivateur contenant aussi bien des enzymes à activités méthyltransférases, hélicases, acétylases remodelant la chromatine (comme PRIC285, CARM1, P68, p300, etc...) que des coactivateurs non enzymatiques comme PGC1 dont le rôle présumé est de stabiliser l'interaction entre PPAR et les autres éléments du complexe coactivateur comme p300. Le recrutement de la machinerie transcriptionnelle puis la transcription du gène métabolique en aval du PPRE peuvent ainsi avoir lieu. PPRE (peroxisome proliferator response element); PPAR (Peroxisome proliferator-activated receptor); RXR (retinoid-X-receptor); NCoR (nuclear receptor) corepressor); SMRT (silencing mediator of retinoid and thyroid hormone receptor); HDAC (histone deacetylase); SRC (steroid receptor coactivator); CARM1

(coactivator arginine methyltransferase); PRIC (PPARα interacting cofactor); PGC1 (Peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1); MED (mediator complex subunit); PIMT/NCoA6IP (PRIP-interacting protein with methyltransferase domain/NCoA6IP); PRIP (peroxisome proliferator-activated receptor-interacting). (Viswakarma et al., 2010).

1.6.2.2 La diversité des isoformes et des fonctions des PPARs

L'isoforme PPAR α est surtout exprimé par les tissus qui possèdent la plus grande capacité à oxyder les lipides, soit les muscles squelettiques et cardiaque, le foie et le tissu adipeux brun (Grygiel-Górniak, 2014). PPARa induit directement l'expression transcriptionnelle des gènes qui codent pour les effecteurs de la captation des acides gras comme LPL, FATP et CD36, de la β-oxydation comme l'acyl-CoA oxydase et CPT1, de l' ω -oxydation comme le cytochrome P450, et de la thermogenèse comme UCP1,2&3 (Lee et al., 2003; Villarroya et al., 2007). Le récepteur PPARα est donc un activateur efficace du catabolisme des lipides. Les ligands naturels préférentiels de PPARα sont l'acide docosahexanoïque (DHA) et l'acide eicosapentanoïque (EPA), deux PUFA de type oméga-3 particulièrement abondants dans les huiles des produits halieutiques (Zhang et al., 2019). Leur affinité avec PPARa est encore plus élevée lorsqu'ils sont transformés en leur forme oxydée au niveau endothélial (Sethi et al., 2002). Les produits de l'enzyme lipogénique FASN, ainsi que les dérivés de l'acide arachidonique, sont des ligands activateurs de PPARa. Les fibrates et leurs métabolites bioactifs, comme les acides clofibrique et fénofibrique, sont des agonistes synthétiques mixtes de PPARa et de PPARy. Leur affinité avec PPARy est 10 fois plus élevée que leur affinité avec PPARa (Grygiel-Górniak, 2014), si bien qu'ils sont souvent présentés comme des agonistes plutôt sélectifs de PPARy.

PPAR β/δ , que l'on nommera PPAR β , est exprimé de manière ubiquitaire mais de manière plus abondante dans le foie, les intestins, les reins, le cerveau, la peau, le tissu adipeux beige et les muscles squelettiques et cardiaque (Grygiel-Górniak, 2014). Les effets de PPAR β sont également cataboliques pour l'essentiel puisque ce facteur induit

l'oxydation des lipides et la thermogenèse. En effet, son activation se traduit par la surexpression des gènes codant pour CPT1, pour la plupart des enzymes β -oxydatives, et pour les protéines UCP1&3 (Wang *et al.*, 2003). De manière cohérente avec les effets qu'il induit, PPAR β compte PGC1 α parmi ses coactivateurs. Les ligands naturels de PPAR β sont l'acide rétinoïque (Shaw *et al.*, 2003) et la prostacycline, une prostaglandine dérivée des eicosanoïdes (Magadum *et al.*, 2017). Ses agonistes artificiels sont le fibrate (Giampietro *et al.*, 2019) et, de manière plus spécifique, la cardarine (GW501516) (Wang *et al.*, 2003).

Complétant la famille des PPARs, et jouant un rôle prépondérant dans la balance énergétique de l'organisme, PPARy est essentiellement actif dans les tissus adipeux blanc et brun, mais il est également retrouvé dans le foie, les intestins, les reins, les cellules lymphoïdes (Grygiel-Górniak, 2014). Quant à son expression dans le muscle, elle est relativement négligeable. PPARy est un facteur de transcription clef de l'adipogenèse, c'est-à-dire la différenciation des fibroblastes en préadipocytes puis en adipocytes mâtures fonctionnels (Lee et al., 2003). Plus exactement, aux stades précoces de l'adipogenèse, les facteurs de transcription C/EBPß et C/EBPδ induisent l'expression de C/EBPa, de SREBP1c, et de PPARy. PPARy induit alors l'expression de C/EBPa, et vice-versa, créant une rétroaction positive favorable à une adipogenèse soutenue. Car dans le même temps, PPARy stimule l'expression des gènes impliqués dans l'internalisation du glucose comme GLUT4, dans la captation des acides gras comme LPL, CD36, FATP et ACS, mais également dans la lipolyse comme HSL et ATGL (Festuccia et al., 2006) et dans la thermogénèse comme UCP1,2&3 (Villarroya et al., 2007). En fait, C/EBPß permet aussi d'induire l'expression de PGC1a (Karamanlidis *et al.*, 2007), ce qui favorise la coactivation de PPARy par PGC1 α , et donc l'expression des gènes thermogènes. Globalement, PPARy permet donc aux tissus adipeux et, dans une moindre mesure au foie, de maximiser leurs fonctions physiologiques de stockage et de catabolisme des lipides afin d'éviter l'accumulation lipotoxique (concept abordé dans la section 1.7.3) de ces derniers dans la circulation, le tissu endothélial, le pancréas et les tissus musculaires, induisant ainsi un phénotype

métabolique sain. Les PUFA de type oméga-6 et oméga-3 (Chene *et al.*, 2007), les acides gras monoinsaturés à longues chaînes C18:1, C20:1 et C22:1 (Senarath *et al.*, 2019; Yang *et al.*, 2013b), l'acide phytanique (Heim *et al.*, 2002), et les eicosanoïdes qui sont des dérivés à fonctions endocrines de l'acide arachidonique (Marion-Letellier *et al.*, 2016), sont tous des ligands naturels de PPARγ. Les glitazones en sont les agonistes artificiels.

1.7 Les effets délétères du débalancement du métabolisme des lipides

Comme nous l'avons vu jusque-là, l'homéostasie des lipides est finement régulée par un équilibre dynamique constant entre les voies de l'anabolisme et les voies du catabolisme des lipides. Toutefois, une perturbation de cet équilibre homéostatique peut survenir et provoquer des complications métaboliques majeures. Par exemple, il peut résulter d'habitudes alimentaires et comportementales inadéquates, conjuguées à des déterminants environnementaux et génétiques défavorables, un emballement des voies anaboliques insuffisamment contrebalancé par le catabolisme. Cela se traduit par un débalancement anabolique propice à l'accumulation excessive des lipides dans l'organisme. L'accumulation des lipides est excessive lorsqu'elle atteint un niveau qui la rend délétère pour le bon fonctionnement des organes et la santé. Une telle accumulation est à la base de la progression de maladies métaboliques majeures comme l'obésité, la stéatose hépatique non alcoolique et le diabète de type2.

1.7.1 L'obésité

1.7.1.1 Les conditions métaboliques associées à l'obésité

L'obésité, cliniquement établie lorsque l'IMC dépasse 30 et 25 kg/m² chez les adultes non asiatiques et asiatiques, respectivement, devient métaboliquement délétère lorsqu'elle est associée au syndrome métabolique. Avec une prévalence populationnelle moyenne de 31% et affectant tout particulièrement les patients obèses,

le syndrome métabolique est caractérisé par un accroissement de l'adiposité abdominale (obésité abdominale), la résistance à l'insuline (associée ou non à un diabète de type 2), une pression artérielle élevée, une dyslipidémie (hausse de la triglycéridémie et de la cholestérolémie et baisse des taux circulants de HDL) potentiellement athérogène, une inflammation chronique de bas grade et l'expression de variants géniques métaboliquement défavorables du gène PPAR γ (Engin, 2017a; Gurnell *et al.*, 2003). L'obésité est une des causes directes du développement de la résistance à l'insuline et du diabète de type 2.

Le stockage obésogène des lipides est essentiellement assuré par le tissu adipeux blanc. Le tissu adipeux brun, lui, a une fonction catabolique thermogène et non seulement il n'est pas en cause dans l'obésité, mais son activation pharmacologique ou naturelle permet même de contrer les effets de l'obésité (Cui & Chen, 2016a). Il est aujourd'hui bien connu que l'impact de l'obésité sur la santé métabolique est en grande partie déterminé par les types de tissus adipeux blanc mobilisés dans le stockage des graisses. Car en effet, le tissu adipeux blanc n'est pas un seul tissu continu, mais il est réparti en différents dépôts anatomiques et en différents sous-types (Tchernof & Després, 2013). D'abord, le tissu adipeux blanc se subdivise fondamentalement en deux grandes catégories : le tissu adipeux sous-cutané (TAS) et le tissu adipeux viscéral (TAV). Le TAS représente l'ensemble des dépôts graisseux répartis à travers l'hypoderme, et situés entre la peau et la fascia musculaire. Dans la région du tronc, le TAS se subdivise à son tour en deux couches, une couche superficielle uniformément à travers l'abdomen et une couche profonde séparée de la couche périphérique par une fascia séreuse (Tchernof & Després, 2013).

Quant au TAV (une composante du tissu adipeux interne), il inclut le tissu adipeux intra-abdomino-pelvien (intra- et extrapéritonéal) et le tissu adipeux intrathoracique dont le dépôt péricardiaque fait partie. Le tissu adipeux intra-péritonéal comprend les tissus adipeux mésentérique et omental, tandis que le tissu adipeux extra-péritonéal inclut le prépéritonéal et le retropéritonéal. Dans les études cliniques, le TAV désigne très souvent les tissus adipeux mésentérique, omental et extrapéritonéal. Le tissu

adipeux épididymaire (gonadal), une autre subdivision du TAV, résiduel chez l'Homme, est l'un des tissus adipeux les plus volumineux chez les rongeurs (Bjørndal *et al.*, 2011).

L'on retrouve également des dépôts adipeux (de plus faible importance d'un point de vue de la masse) au niveau des muscles et des os (Schoettl *et al.*, 2018). Une composante relativement nouvelle du TAV, nommée « ligament rond », a été décrite chez des patients atteints d'obésité morbide. Cette structure adipeuse localisée autour du foie aurait des effets protecteurs contre l'inflammation associée à l'obésité (Desmarais *et al.*, 2018; Mauriege *et al.*, 2016). La figure 1.22 propose une schématisation exhaustive de la distribution anatomique des différents dépôts de TAV et de TAS, en plus du tissu adipeux brun, chez les rongeurs et les humains métaboliquement sains. Avec les adipocytes blancs mâtures comme principales unités fonctionnelles, et parsemés d'adipocytes beiges sporadiques à des taux très variables (différentiés comme tel à la manière expliquée plus haut), ce sont aussi bien le TAV et le TAS qui interviennent majoritairement dans le stockage de l'énergie chimique excédentaire sous forme de triglycérides, chez les mammifères.



Figure 1.22 : Répartition des différents types de tissu adipeux chez les rongeurs et les humains. Précisions que le tissu adipeux blanc périgonadal est également appelé tissu adipeux épididymaire par d'autres auteurs. (Schoettl *et al.*, 2018).

Chez les patients obèses, l'abondance relative du TAV par rapport au TAS varie selon des déterminants de gène et de genre. En résumé, le modèle classique explique que le TAS, très sensible à l'insuline, a une haute capacité à emmagasiner l'énergie consommée en excès, servant alors de réserve lipidique protectrice contre les complications métaboliques. En revanche, dans le cas où le TAS est absent ou que des facteurs physiologiques environnementaux et génétiques (résistance à l'insuline du TAS, tabagisme, lipodystrophies, sexe, etc.) en limitent la capacité de stockage des lipides, ces derniers sont beaucoup plus susceptibles de s'accumuler en excès dans le gras hépatique, intramusculaire, péricardiaque, et aussi dans le TAV (Despres & Lemieux, 2006). C'est le stockage ectopique des lipides, un phénomène connu pour aggraver le syndrome métabolique, la résistance à l'insuline, et la toxicité associée aux lipides. L'adiposité est déterminée par un dimorphisme sexuel qui fait consensus : tandis que les femmes obèses présentent généralement une accumulation de graisses

dans le TAS supérieure à celle du TAV, c'est exactement le contraire chez l'homme. Or, une adiposité sous-cutanée est associée à moins de complications métaboliques et à une moindre contribution au diabète de type 2, par rapport à l'adiposité viscérale qui induit la dyslipidémie, la libération accrue d'acides gras libres en circulation, la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires par le tissu adipeux, la résistance à l'insuline, et l'hyperinsulinémie (Gesta et al., 2007; Matsha et al., 2019; Tchernof & Després, 2013). Par contre, Matsha et al. ont aussi démontré que l'augmentation du TAS chez les hommes pourrait leur être métaboliquement délétère. Il a par ailleurs été démontré que l'expansion de la couche profonde du TAS est plus rapide que celle de la couche superficielle, et qu'elle est fortement corrélée à l'expansion du TAV et à l'apparition de l'inflammation, de la résistance à l'insuline et des risques cardiovasculaires (Marinou et al., 2014). Outre l'abondance relative des deux soustypes de tissu adipeux blanc, l'impact de l'obésité sur le métabolisme est aussi déterminé par les caractéristiques individuelles des adipocytes (Ghaben & Scherer, 2019). La prise de masse adipeuse viscérale et sous-cutanée par l'induction de l'hyperplasie (par exemple au moyen de l'agonisme de PPARy avec le Troglitazone) plutôt que de l'hypertrophie adipocytaire, réduit les risques d'hyperinsulinémie, d'inflammation chronique de bas grade et de dyslipidémie (Adams et al., 1997; Hansson et al., 2019; Okuno et al., 1998). Autrement dit, la taille des adipocytes est corrélée avec la sévérité des symptômes clefs de l'obésité.

1.7.1.2 L'adipogenèse et l'expansion du tissu adipeux, sous-jacents de l'obésité

L'adipogenèse est un processus à plusieurs étapes qui consiste à engager des progéniteurs mésenchymateux *fibroblast-like* dans une voie de différentiation adipocytaire sous l'effet de la voie des *bone morphogenic proteins* (BMP) (Ghaben & Scherer, 2019; Wang *et al.*, 1993). Le progéniteur préadipocytaire ainsi obtenu, qui se caractérise par l'expression du facteur de transcription ZFP423 qui sensibilise la cellule aux BMP, accroît son volume (Ghaben & Scherer, 2019; Gupta *et al.*, 2010). En même temps que cette croissance cellulaire, la voie de signalisation des BMP active le facteur

de transcription SMAD4 qui active l'expression du gène codant pour PPAR γ . Ainsi, au terme de cette hypertrophie cellulaire, les facteurs clefs des phases précoces de l'adipogenèse, c'est-à-dire PPAR γ et les C/EBP α/β , peuvent agir en synergie pour induire l'expression des gènes indispensables à la captation des acides gras et des glucides, à l'estérification des lipides, et à la régulation de l'activité des gouttelettes lipidiques, marquant progressivement la différentiation du progéniteur en préadipocyte puis en adipocyte mâture fonctionnel (Ghaben & Scherer, 2019).

L'expansion du tissu adipeux, en réponse à une balance énergétique positive, peut se dérouler de deux manières, soit par la différentiation de préadipocytes périvasculaires en autant d'adipocytes mâtures, dans un processus d'hyperplasie adipocytaire, ou par l'hypertrophie d'adipocytes mâtures déjà existants (donc préalablement différenciés) pour en accroître les capacités de stockage de triglycérides (Ghaben & Scherer, 2019). Mais en amont de ces deux processus, se déroulent inévitablement les phases précoces de l'adipogenèse.

L'expansion adipeuse par hyperplasie est relativement peu délétère pour la santé métabolique. En effet, lors d'une expansion adipeuse par hyperplasie, le tissu adipeux blanc se développe en harmonie avec l'angiogenèse, optimisant l'irrigation, la survie et l'intégrité des adipocytes. Cela a pour effet de prévenir l'inflammation chronique du tissu adipeux blanc. Or, la préservation de l'activité et de l'intégrité optimales des adipocytes permet une sécrétion continue d'adiponectines, de leptine, et de FGF21, et l'absence de sécrétion de facteurs pro-inflammatoires, tout cela contribuant à prévenir la résistance à l'insuline spécifique aux tissus métaboliques, et à une régulation optimale du comportement alimentaire.

En revanche, l'hypertrophie adipocytaire est un processus qui se fait trop rapidement sans être accompagné d'une angiogenèse efficace, entrainant l'hypoxie locale et l'apoptose voire la nécrose de plusieurs adipocytes, ce qui favorise l'infiltration et l'activation de macrophages pro-inflammatoires ainsi que la fibrose, dans une dynamique semblable à ce qui se déroule lors de la *non-alcoholic fatty liver disease* (NAFLD). Or, les facteurs inflammatoires au niveau du tissu adipeux entrainent la résistance à l'insuline au niveau adipeux, ce qui se traduit par une lipolyse accrue (puisque l'insuline perd sa capacité à inhiber la lipolyse), et une élévation des taux circulants de lipides et de cholestérol libres. Ces derniers favorisent à leur tour le syndrome métabolique, le stockage ectopique des graisses et la stéatose hépatique. Dans un tel contexte, l'obésité devient très vite la cause d'un emballement effréné de complications métaboliques (Ghaben & Scherer, 2019).



Figure 1.23 : Hyperplasie et hypertrophie, deux modes distincts d'expansion adipeuse avec des conséquences diamétralement opposées. Cette figure schématise les microenvironnements tissulaires distincts créés par l'hyperplasie adipocytaire et l'hypertrophie adipocytaire et ce pourquoi ils se traduisent, respectivement, par une obésité métaboliquement saine et une obésité compromettante pour la santé métabolique. FGF21 (*fibroblast growth factor 21*) ; G1, S, G2, M (phases du cycle cellulaire : *Growth 1, DNA synthesis, Growth 2, mitosis*). (Ghaben & Scherer, 2019).

1.7.2 La stéatose hépatique non alcoolique (NAFLD)

1.7.2.1 La pathophysiologie de la NAFLD

Estimée à près de 30% de la population occidentale totale, la prévalence de la NAFLD atteint 74% dans la population obèse (Angulo, 2002; Milic & Stimac, 2012). La NAFLD est définie comme une maladie progressive initiée par une accumulation excessive de triglycérides (ou simple stéatose) dans le foie de patients dépourvus d'antécédents d'alcoolisme, d'hépatites virales ou de maladies auto-immunitaires (Cohen et al., 2011; Fabbrini et al., 2010; Lounis et al., 2015a). La stéatose, qui est le premier stade de la maladie, est établie d'un point de vue biochimique lorsque la masse des triglycérides hépatiques excède 5% de la masse totale du foie (Fabbrini et al., 2010). D'un point de vue histologique, elle est établie lorsque plus de 5% des hépatocytes (unités fonctionnelles du foie) renferment des gouttelettes lipidiques visibles (Fabbrini et al., 2010). Au-delà de ce seuil, la stéatose hépatique est associée à une multitude de dommages hépatiques et métaboliques dont la progression définit le spectre de la NAFLD proprement dite (Postic & Girard, 2008a). La sévérité de la NAFLD est directement associée au pourcentage d'accumulation des triglycérides dans le foie. Jusqu'à 5% d'accumulation, le foie est métaboliquement sain, entre 5 et 33% c'est le premier grade (léger), entre 34 et 66% c'est le deuxième grade (modéré), et au-delà de 66% c'est le troisième grade (le plus sévère) de la stéatose hépatique (Nassir et al., 2015).

Les triglycérides ne sont pas eux-mêmes responsables des symptômes liés à la maladie car ils ne sont pas réactifs en tant que lipides neutres. Par contre, l'accumulation excessive des triglycérides entraine une saturation de la capacité du foie à convertir en triglycérides les acides gras et le cholestérol libres. Ce sont ces derniers qui induisent alors des effets délétères définissant la lipotoxicité. Donc, l'accumulation des triglycérides hépatiques est un marqueur de la gravité de la NAFLD, car elle peut suggérer que les lipides non estérifiés sont à des concentrations lipotoxiques (Buzzetti *et al.*, 2016; Nassir *et al.*, 2015).

Bien que réversible, la stéatose peut également évoluer en stéatohépatite non alcoolique (NASH) si l'accumulation excessive des triglycérides hépatiques, par rapport aux pourcentages susmentionnés, est soutenue dans le temps. La NASH est donc le second stade de la NAFLD, et elle se caractérise par des dommages tissulaires importants et l'induction d'un environnement pro-inflammatoire, au niveau hépatique comme au niveau systémique (Neuschwander-Tetri & Caldwell, 2003). Les dommages tissulaires, en histologie, sont alors révélés par la ballonisation des hépatocytes augurant de leur état pré-apoptotique, la présence des foyers de nécroses hépatiques (corps de Mallory), et l'apparition d'une fibrose tissulaire par infiltration de tissu cicatriciel (Neuschwander-Tetri & Caldwell, 2003). D'un point de vue biochimique, ces dommages tissulaires résultent en l'élévation des niveaux circulants de transaminases d'origine hépatique, notamment l'aspartate aminotransférase (AST) et l'alanine aminotransférase (ALT) (Machado & Cortez-Pinto, 2014). Quant à l'inflammation, elle est associée à une sécrétion accrue, par les hépatocytes, de facteurs proinflammatoires comme l'IL6 (interleukine 6) et le TNF α (*Tumor necrosis factor* α) qui ont pour effets de stimuler l'infiltration et l'activité hépatotoxique des macrophages résidants du foie, aussi appelés cellules de Kupffer (Li & Diehl, 2003; Odegaard et al., 2008). Les foyers inflammatoires formés par les regroupements de lymphocytes et de cellules de Kupffer sont d'ailleurs facilement identifiables par immunodétection au moyen de l'antigène de surface glycoprotéique F4/80 qu'ils expriment, ou par simple analyse histochimique (Dixon et al., 2013). Les facteurs pro-inflammatoires générés par le foie ont également pour effets de favoriser une inflammation systémique chronique de bas grade, un des principaux symptômes de l'obésité (Berlanga et al., 2014a; Haslam & James, 2005). Chez 5 à 10% des patients obèses atteints de NAFLD, la maladie peut progresser vers des stades plus graves et irréversibles de cirrhose non alcoolique, voire même de décompensation hépatique ou d'hépatocarcinome (Buzzetti et al., 2016). La décompensation hépatique qui survient durant la cirrhose est définie comme une grave détérioration des fonctions du foie, qui se manifeste cliniquement par une jaunisse, une ascite, une encéphalopathie hépatique d'origine hépatique, une

dysfonction rénale, et des hémorragies variqueuses dans le système digestif (Mansour & McPherson, 2018).



Figure 1.24 : Schématisation de la progression de la NAFLD. Ce schéma représente les différents stades de la NAFLD, depuis un foie sain normal jusqu'à l'hépatocarcinome, en passant par une simple stéatose (foie gras) puis par la NASH et la cirrhose. Les coupes histologiques, de gauche à droite, montrent le tissu d'un foie sain, d'un foie avec stéatohépatite (gonflement cellulaire et accumulation de gouttelettes lipidiques), et d'un foie avec une fibrose (infiltration péricellulaire et périvasculaire de fibres de collagène). NASH (*non-alcoholic steatohepatitis*) ; H&E (coloration histologique à l'hématoxyline et l'éosine) ; MT (coloration histologique au trichrome de Masson). (Lounis *et al.*, 2015a).

La NAFLD est d'une telle complexité, tant d'un point de vue de son étiologie que de ses conséquences sur la santé, que la succession des événements sous-tendant sa pathophysiologie et sa progression sont constamment révisés. La progression de la
NAFLD a longtemps reposé sur le modèle du *two-hit* qui stipulait, en bref, que l'accumulation des triglycérides hépatiques (simple stéatose) constituait obligatoirement l'étape initiatrice de la maladie qu'une seconde lésion (par exemple l'arrivée massive de lipides ou de xénobiotiques pro-inflammatoires, ou un stress oxydatif) faisait progresser au stade de NASH (Buzzetti *et al.*, 2016; Day & James, 1998). Aujourd'hui, ce modèle est délaissé au profit du modèle plus complexe du *multi-hit* qui décrit la NAFLD comme un enchevêtrement complexe de dysfonctionnements métaboliques interdépendants les uns des autres (Buzzetti *et al.*, 2016). La séquence des événements est décrite suivant un schéma linéaire, pour en faciliter la compréhension, mais en réalité, chaque événement peut intervenir à différents stades de la maladie.

1.7.2.2 Les mécanismes moléculaires sous-jacents à la progression de la NAFLD

De mauvaises habitudes alimentaires, associées à un comportement sédentaire, sont responsables d'un apport trop élevé en glucides et en lipides, insuffisamment compensé par la dépense énergétique. La cause d'un tel déséquilibre repose en grande partie sur la consommation anormalement élevée des nutriments prolipogéniques comme les carbohydrates et les graisses. Au niveau du foie, qui est le premier organe de destination des nutriments par la circulation porte-hépatique et qui est un des tissus cibles de l'insuline, la DNL et l'estérification des acides gras sont inévitablement accrues sous l'effet de l'activation des facteurs lipogéniques SREBP1c, ChREBP et PPARy. En contrepartie, la voie de la β -oxydation est inhibée par la DNL. En effet, le malonyl-CoA, un intermédiaire métabolique de la voie de la DNL, agit comme un inhibiteur allostérique naturel du transporteur CPT1 (Lloyd et al., 1986; Solinas et al., 2015). Un tel débalancement favorise dans un premier temps la simple stéatose hépatique. La captation des lipides est également accrue au niveau du foie. Or, ce dernier a une capacité relativement limitée (par rapport à d'autres tissus comme le tissu adipeux) à stocker les lipides sous forme de triglycérides. À cela s'ajoute le fait que la β -oxydation est altérée pour la raison susmentionnée. Il en résulte fatalement une accumulation hépatique lipotoxique d'acides gras et de cholestérol libre (lipides non estérifiés), ainsi qu'une sécrétion accrue de VLDL participant à la dyslipidémie. Les lipides non estérifiés dans le foie sont connus pour endommager gravement l'autophagie et la lipophagie, contribuant de cette manière à l'altération du tissu hépatique, à l'accumulation de toutes les formes de lipides, et à un remodelage du phospholipidome membranaire dommageable pour les voies de signalisations ainsi que pour les organelles. À des stades plus avancés, l'accumulation non maitrisée des lipides non estérifiés et de leurs dérivés (céramides et lipides peroxydés) altère davantage les fonctions mitochondriales, comme la respiration mitochondriale, accentue le remodelage du phospholipidome (chute des phosphatidylcholines) et provoque l'accumulation des radicaux libres. En réponse aux acides gras libres et au stress oxydatif, mais également à l'accumulation inévitable de protéines mal repliées, l'inflammation et le stress du réticulum endoplasmique sont induits, menant à la NASH. Ce sont les voies inflammatoires JNK-AP-1, IKK-NF-kB, et celles des inflammasomes, avec en bout de ligne une sécrétion continue d'interleukine-6, de tumor necrosis factor- α (TNF α) et d'interleukine-1 β , par les hépatocytes et par les cellules de Kupffer, qui sont activées. La voie des unfolded protein response (UPR) qui est aussi induite, se traduit par l'activation de la c-jun N-terminal kinase (JNK). JNK, en plus de promouvoir l'apoptose, favorise l'inflammation via la voie impliquant le facteur de transcription AP-1. En outre, la voie UPR a comme conséquence collatérale l'activation accrue de SREBP1c, alimentant le cercle vicieux qui unit la DNL, la NAFLD et le stress du réticulum endoplasmique.

Une autre des conséquences majeures de la NAFLD est la résistance à l'insuline, c'està-dire la perte partielle ou totale de la capacité des organes métaboliques à activer les voies signalétiques induites par l'insuline (Petersen & Shulman, 2018). En bref, les diglycérides et les acides gras libres, ainsi que les médiateurs de l'inflammation et du stress du réticulum endoplasmique comme JNK et NF-κB, tous abondants dans les hépatocytes durant la NAFLD, altèrent les voies de signalisation de l'insuline en induisant la phosphorylation inhibitrice directe, en résidus sérines, du récepteur à l'insuline et des IRS qui perdent alors leur capacité à recruter la PI3K (Draznin, 2006). À mesure que l'inflammation chronique aggrave la résistance à l'insuline, même au niveau adipeux, l'insuline perd sa capacité à inhiber la lipolyse du tissu adipeux, ce qui se traduit par la libération accrue d'acides gras libres et de cholestérol dans le sang, aggravant l'afflux stéatogène de lipides vers le foie (Brown & Goldstein, 2008; Petersen & Shulman, 2018). En outre, la hausse constante de la lipémie et de la glycémie se traduit par des mécanismes de lipotoxicité et de glucotoxicité en périphérie, y compris dans les cellules- β du pancréas, aboutissant à l'altération de leur fonction sécrétrice d'insuline. Cela se manifeste, cliniquement, par un diabète de type 2 (Poitout *et al.*, 2010b). C'est d'ailleurs pour cela que la résistance à l'insuline est un facteur contributeur majeur au diabète de type 2 dont l'hyperglycémie, l'hyperinsulinémie et l'hypertriglycéridémie sont la signature (Brown & Goldstein, 2008). Pour toutes ces raisons il est bien établi que l'obésité contribue en amont à l'apparition de la résistance à l'insuline et du diabète de type 2 (Eckel *et al.*, 2011).

Quant à la complication de la NAFLD en fibrose, c'est-à-dire l'infiltration d'une trame cicatricielle irréversible de collagènes et d'élastines à travers le tissu hépatique, elle est due à la transdifférenciation des cellules stellaires hépatiques (HSC, pour *hepatic stellate cells*) en myofibroblastes (Higashi *et al.*, 2017). Ce phénomène de transdifférenciation des HSC (aussi appelé « activation des HSC ») est essentiellement stimulé par les espèces réactives d'oxygène et plusieurs cytokines proinflammatoires (Higashi *et al.*, 2017).

Une des composantes non négligeables du *multi-hit* est la dysbiose intestinale qui affecte potentiellement les mammifères obèses, stéatosés, ou encore ceux atteints de diabète de type 2. Le lien de cause à effet entre l'équilibre du microbiote intestinal et la condition métabolique est extensivement décrit dans notre revue de littérature présentée en annexe A de la présente thèse (Rial *et al.*, 2016a), mais également par plusieurs autres auteurs. En bref, la dysbiose qui survient au niveau de la lumière intestinale peut être décrite comme la perte des bactéries commensales bénéfiques

(comme Akkermansia muciniphila), la prolifération de bactéries pathogènes, une baisse de la biodiversité microbienne, ou une combinaison des trois dommages (DeGruttola et al., 2016). Chez les patients obèses métaboliquement altérés, la dysbiose se caractérise par une hausse substantielle (de près de 60 à près de 80%) de l'abondance relative des bactéries du phylum des firmicutes et une baisse de l'abondance relative (de près de 40 à près de 20%) des *bacteroidetes* (Delzenne & Cani, 2011; Serino *et al.*, 2012). Ce déséquilibre est souvent associé à une altération de la biosynthèse des acides gras à chaînes courtes (SCFA, pour short-chain fatty acids) par les bactéries du microbiote intestinal, avec comme principale conséquence une hausse de la perméabilité intestinale et une diminution de l'action immunomodulatrice des cellules Treg, favorisant l'inflammation intestinale. En outre, la hausse relative du nombre de firmicutes par rapport aux bacteroidetes impliquerait, par des mécanismes qui restent à démontrer (impliquant très probablement le système immunitaire au niveau intestinal), une importante lyse des bactéries Gram-négatives, se traduisant par la libération des LPS (lipopolysaccharides) au niveau intestinal (Blaut & Klaus, 2012; Cani, 2012; Cani & Everard, 2016). Ces derniers, à la faveur de l'altération de la barrière intestinale, s'y infiltrent. Il s'en suit donc l'élévation des concentrations intestinales et circulantes de LPS proinflammatoires, établissant une endotoxémie proprement dite. Les LPS activent les voies cellulaires induites par les récepteurs TLR4 (Toll like receptor 4) tant au niveau intestinal qu'en périphérie, notamment dans le foie et le tissu adipeux, y stimulant la production de cytokines pro-inflammatoires (den Besten et al., 2013a; den Besten et al., 2013b). Dans l'intestin, cela aggrave l'inflammation et la perméabilité intestinale, tandis que dans le foie, cela accentue l'activation des cellules de Kupffer, et donc la NAFLD et la résistance à l'insuline (Cani, 2012; Cani & Everard, 2016).



Figure 1.25 : Schématisation du modèle du *multi-hit* **causant la NAFLD**. Cette figure illustre la relation étroite entre l'obésité, la NAFLD, la résistance à l'insuline et la dysbiose intestinale, avec les mécanismes sous-jacents de l'inflammation, du stress oxydatif et du stress du réticulum endoplasmique. Les détails explicatifs sont présentés dans le paragraphe précédent. TNF-a (*tumor necrosis factor-alpha*) ; IL-6&1B (interleukins 6 & 1B) ; DNL (*de novo lipogenesis*) ; VLDL (*very low density lipoproteins*) ; ROS (*reactive oxygen species*) ; FFA (*free fatty acids*) ; ER (*endoplasmic reticulum*); UPR (*unfolded proteins response*); TG (*triglycerides*); LPS (*lipopolysaccharides*). (Buzzetti *et al.*, 2016).

1.7.3 La lipotoxicité

1.7.3.1 La lipoapoptose

La résistance à l'insuline et le diabète de type 2 associés à l'obésité et à la NAFLD se traduisent par l'élévation des niveaux circulants des acides gras libérés par le tissu adipeux. Plus spécifiquement, lorsque le tissu adipeux devient résistant à l'insuline, l'insuline perd sa capacité à y inhiber la lipolyse. Donc, la résistance à l'insuline induit

une activité lipolytique non régulée dans le tissu adipeux. Les acides gras libérés par le tissu adipeux en condition de NAFLD représentent jusqu'à 82% des acides gras circulants totaux, et servent de précurseurs à près de 60% des triglycérides hépatiques (Donnelly *et al.*, 2005). Leur impact sur la santé métabolique est donc majeur. Ces acides gras libres endogènes et exogènes, une fois internalisés en excès dans des tissus à vocation oxydative et non de stockage (comme les muscles et le foie) entrainent des dommages cellulaires. Ces dommages consistent en des dysfonctions mitochondriales, du stress oxydatif, et le dérèglement des voies de signalisations. C'est la lipotoxicité (Lee *et al.*, 1994; Yazici & Sezer, 2017).

Tous les acides gras ne présentent pas le même potentiel lipotoxique. Les acides gras monoinsaturés à chaînes longues, comme les acides oléique et palmitoléique, sont moins lipotoxiques que leurs formes saturées respectives, les acides stéarique et palmitique (Maedler *et al.*, 2001). Il a même été démontré que l'acide oléique pouvait exercer un effet protecteur contre la lipotoxicité induite par le palmitate dans divers types de cellules (Chen *et al.*, 2018; Gao *et al.*, 2009; Miller *et al.*, 2005). Cela s'explique clairement par deux phénomènes. D'abord, les acides gras monoinsaturés sont les plus préférentiellement mobilisés pour la synthèse des triglycérides tandis que les acides gras saturés, seuls, ne le sont que dans une bien moindre mesure. Les acides gras saturés sont donc plus prompts à s'accumuler. (Miyazaki *et al.*, 2000; Ricchi *et al.*, 2009). De plus, lorsque des cellules sont exposées à des acides gras monoinsaturés en même temps, il a été que les acides gras monoinsaturés stimulent la synthèse des triglycérides en général et donc leur propre estérification de même que celle des acides gras saturés, limitant la toxicité de ces derniers (Chen *et al.*, 2003b; Moravcova *et al.*, 2015).

Quant aux acides gras polyinsaturés, ils ont des effets complètement différents dépendamment de leur niveau d'insaturation et de leurs abondances relatives. En effet, les acides gras polyinsaturés de type oméga-3, et plus particulièrement le DHA et l'EPA, exercent des effets anti-inflammatoires protecteurs contre la progression de la NAFLD et des risques cardiométaboliques associés. Les oméga-6, eux, en trop grandes

proportions par rapport aux oméga-3, ainsi que leurs dérivés (prostaglandines, thromboxanes, leucotriènes et lipoxines) sont pro-inflammatoires et induisent tous les effets lipotoxiques de la NAFLD et de l'obésité (Jeyapal *et al.*, 2018; Monteiro *et al.*, 2014). D'ailleurs, la diète dite « de type occidental » (*Western diet*) doit son impact délétère sur la santé métabolique en partie à son ratio oméga-6/oméga-3 trop élevé (Simopoulos, 2016). À l'inverse, des ratios hépatiques oméga-3/oméga-6 élevés sont en général associés à une bonne santé métabolique ou alors à une stéatose sans inflammation et sans lipotoxicité (Desmarais *et al.*, 2019).

Les acides gras libres à chaînes longues, et en particulier les formes saturées qui sont donc les plus lipotoxiques, entrainent l'apoptose d'une large gamme de cellules ; ce qui inclut les cellules comme les hépatocytes (Chen *et al.*, 2018; Rial *et al.*, 2018a), les cellules- β pancréatiques (Liu *et al.*, 2018b; Maedler *et al.*, 2001), les myocytes squelettiques et cardiaques (Zhang *et al.*, 2017b; Zou *et al.*, 2017), mais aussi les podocytes rénaux (Jiang *et al.*, 2017; Liu *et al.*, 2018a) ou encore les neurones (Mayer & Belsham, 2010). L'apoptose induite par les acides gras libres est appelée la lipoapoptose (Malhi & Gores, 2008). Plusieurs voies de signalisations y conduisent.

D'abord, les acides gras libres lipotoxiques activent la voie apoptotique intrinsèque mitochondriale par l'intermédiaire des effecteurs du stress du réticulum endoplasmique qu'ils induisent. Plus exactement, lorsque la kinase JNK est activée par phosphorylation lors du stress du réticulum endoplasmique, comme par exemple au sein d'hépatocytes stéatosés, elle active à son tour la protéine proapoptotique *B-cell lymphoma 2 (Bcl-2)-associated X protein* (Bax) (Malhi & Gores, 2008). Bax entraine ensuite la perméabilisation mitochondriale, la libération du cytochrome c dans le cytosol, puis la formation du complexe Apaf-1/cytochrome c qui dirige le clivage activateur des caspases apoptotiques 3 et 7 (Li *et al.*, 1997). Dans le même temps, les acides gras libres sont aussi capables d'activer directement Bax (Epand *et al.*, 2004). L'activation de Bax permet la perméabilisation des lysosomale est orchestrée par la cathepsine B qui, à pH cytosolique neutre une fois libérée du lysosome perméabilisé,

devient active et catalyse le clivage activateur de la caspase 3 (Sendler et al., 2016). D'une manière très intéressante pour la compréhension de la pathogenèse de la NASH notamment, il a aussi été mis en évidence que l'induction de la voie apoptotique lysosomale se traduit par l'activation de l'axe pro-inflammatoire NF- κ B/TNF α (Malhi & Gores, 2008). En outre, les acides gras saturés activent, vraisemblablement via les effecteurs du stress du réticulum endoplasmique, la protéine phosphatase 2A qui induit la déphosphorylation activatrice et la translocation nucléaire du facteur de transcription FoxO3a. Ce dernier active l'expression de gènes apoptotiques comme le Bcl-2interacting mediator of cell death (Barreyro et al., 2007; Malhi & Gores, 2008). Enfin, même la voie extrinsèque de l'apoptose, qui est la voie qui médie la mort cellulaire en réponse à des facteurs extracellulaires comme le TNFa, le FS-7-associated surface antigen ligand (Fas-L) et le tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand (TRAIL), est stimulée par l'accumulation stéatogène des acides gras libres, incluant les monoinsaturés (Malhi et al., 2007). Il a en effet été démontré que l'expression des récepteurs aux facteurs Fas-L et TRAIL était induite au niveau transcriptionnel par des traitements aux acides gras libres, et que ces deux récepteurs étaient surexprimés dans des foies humains stéatosés (Malhi et al., 2007). Or, lorsque les récepteurs aux Fas-L et TRAIL (Fas et TRAIL-R) sont agonisés ils induisent la voie extrinsèque de l'apoptose. Tous ces mécanismes apoptotiques expliquent en grande partie les dysfonctions hépatiques et pancréatiques associées à la NAFLD, l'obésité, la résistance à l'insuline et le diabète de type 2.



Figure 1.26 : Mécanismes de la lipoapoptose. Cette figure schématise les mécanismes *via* lesquels les acides gras saturés (acides palmitique et stéarique) et monoinsaturés (ici l'oléate) sensibilisent un hépatocyte stéatosé à la voie extrinsèque de l'apoptose, tout en y induisant les voies mitochondriale et lysosomale de l'apoptose. Fas (*Fas cell surface death receptor*) ; TRAIL (*tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand*) ; TRAIL-R2 (*TRAIL receptor 2*) ; P (groupement phosphate) ; JNK (*C-jun N-terminal kinase*) ; Sp1 (facteur de transcription Sp1) ; FoxO3a (*Forkhead box O3a*) ; PP2A (phosphatase 2A) ; Bim (*Bcl-2-interacting mediator of cell death*) ; Bax (*B-cell lymphoma 2 (Bcl-2)-associated X protein*). (Malhi & Gores, 2008).

De plus, comme ces maladies créent un contexte physiologique favorable à une hausse des niveaux circulants et tissulaires d'acides gras libres et de glucose, la toxicité de ce dernier, particulièrement au niveau des cellules- β du pancréas, s'ajoute à la lipotoxicité,

précipitant la mort cellulaire. C'est le concept de glucolipotoxicité (Poitout *et al.*, 2010a; Prentki *et al.*, 2002).

1.7.3.2 Les dysfonctions mitochondriales induites par les acides gras

En lien direct avec l'apoptose et la résistance à l'insuline, une composante majeure de la lipotoxicité est la dysfonction mitochondriale (Garcia-Ruiz et al., 2015; Neuschwander-Tetri, 2010; Oh et al., 2018; Schrauwen et al., 2010). Dans les hépatocytes, les acides gras libres saturés altèrent significativement le rendement de la phosphorylation oxydative en accélérant la dégradation protéolytique des complexes de la chaîne de transport électronique, et en affectant drastiquement l'intégrité de l'ADN mitochondrial et l'expression des gènes codant pour les sous-unités protéiques des complexes de la chaîne de transport électronique (Garcia-Ruiz et al., 2015). Cela se traduit par un effondrement voire une perte totale (pour les mitochondries mortes) du potentiel de membrane mitochondrial, entrainant le déclin énergétique et l'apoptose de la cellule (Yang et al., 2019). En outre, la phosphorylation oxydative mitochondriale est aussi directement altérée par le stress oxydatif qu'induisent les acides gras libres (Garcia-Ruiz et al., 2015). De plus, et c'est le cas dans divers types de cellules métaboliques (Oh et al., 2018; Tumova et al., 2016), les acides gras libres en excès altèrent la β-oxydation. Cela a non seulement pour effet d'induire un cercle vicieux favorisant plus d'accumulation lipidique, mais aussi de favoriser l'accumulation des espèces réactives d'oxygène, aggravant le stress oxydatif. Ce dernier entraine à son tour l'altération des membranes par la peroxydation des lipides, l'altération des voies de signalisation, ainsi que l'inflammation et l'apoptose (Schrauwen et al., 2010).

1.8 La lutte contre les maladies métaboliques via la nutraceutique

Les points précédents montrent toute la complexité entourant la régulation du métabolisme des lipides et l'étendue des impacts défavorables d'une accumulation excessive de lipides dans l'organisme. Un apport excessif de lipides, par des diètes grasses, est un facteur contributeur à l'emballement anabolique qui conduit à

l'accumulation métaboliquement délétère des lipides, et donc à l'obésité, à la NAFLD et au diabète de type 2. Compte tenu de l'urgence sanitaire que représente la nécessité de combattre les maladies métaboliques, plusieurs stratégies sont explorées depuis plusieurs décennies. Ces stratégies, souvent très prometteuses d'ailleurs, incluent la limitation de l'apport calorique (Harvey-Berino, 1999), la promotion de la dépense énergétique par l'activité physique (Pietilainen *et al.*, 2008), l'usage d'agents pharmacologiques (Velazquez & Apovian, 2018), et l'induction de la thermogenèse par des interventions alimentaires ou pharmacologiques (Cui & Chen, 2016b; Marinovic *et al.*, 2018; Nirengi *et al.*, 2016; Ohno *et al.*, 2012; Velickovic *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2017a). Ces stratégies ont toutes en commun d'accroitre la dépense de l'énergie par l'accroissement de la balance catabolisme : anabolisme. La nutraceutique, la science qui consiste à caractériser les fonctions bioactives des aliments dans des visées thérapeutiques, est une source d'innovation inépuisable pour le traitement des maladies métaboliques.

1.8.1 Les caractéristiques générales des lipides à chaînes moyennes

Les acides gras à chaînes moyennes (MCFA) sont des molécules d'acides gras saturées dont la longueur des chaînes carbonées varie entre 6 et 10 atomes de carbone. Chez les mammifères, les MCFA sont essentiellement fournis par la diète où ils se retrouvent sous leur forme estérifiée triglycérique. Ce sont les triglycérides à chaînes moyennes (MCT). Toutefois, lors du processus de la digestion, la plupart des MCT sont hydrolysés en MCFA libres. Ces derniers ainsi que les MCT résiduels sont absorbés avec une grande efficacité et présentent des effets métaboliques très similaires (Babayan, 1987; Bach & Babayan, 1982). Le groupe des MCFA comprend l'hexanoate (ou acide caproïque, C6 :0, ou C6), l'octanoate (ou acide caprylique, C8 :0, ou C8) et le décanoate (ou acide caprique, C10 :0, ou C10) (Babayan, 1987; Bach & Babayan, 1982). Le dodécanoate (ou acide laurique, C12 :0) est aussi considéré par certains auteurs comme un MCFA (Hu *et al.*, 2011), mais sa classification demeure discutable

car, contrairement aux acides gras à chaînes plus courtes, il tend à augmenter la cholestérolémie et il est davantage incorporé et stocké sous forme de triglycérides dans le foie (McCarty & DiNicolantonio, 2016). Les plus importantes sources de MCT sont les huiles de noix de coco, et les graines de palmiste et de cuphea qui est une plante des régions tropicales sud-américaines. Les MCT constituent souvent jusqu'à 60% (voire plus) de la masse lipidique totale de ces huiles végétales (Cardoso *et al.*, 2015; Graham, 1989; Lee *et al.*, 2014b). Par ailleurs, à la faveur de certaines conditions d'élevages, les MCT peuvent également se retrouver, mais à de plus faibles proportions, dans le lait de vache, où ils peuvent atteindre jusqu'à 14% de la masse lipidique totale (Jensen, 2002).

Les MCT se distinguent à plusieurs égards des LCT (triglycérides à longues chaînes) au regard de leurs propriétés biochimiques particulières. Ces différences au niveau moléculaire se traduisent par des impacts physiologiques particuliers qui sont à la base des propriétés métaboliques bénéfiques souvent attribuées aux MCT. Pour cette raison d'ailleurs, les MCT et les MCFA sont de plus en plus décrits comme des lipides bioactifs aux effets potentiellement bénéfiques sur le métabolisme (Aluko, 2012; Nagao & Yanagita, 2008).

1.8.2 Les lipides à chaînes moyennes : des lipides bioactifs

Les lipides bioactifs font partie des aliments fonctionnels. C'est-à-dire qu'en plus de leur rôle essentiel dans l'homéostasie énergétique, ils peuvent intervenir directement dans la régulation de certaines fonctions biologiques et promouvoir des effets bénéfiques pour la santé. Les lipides et leurs métabolites sont reconnus comme tel s'ils agissent en remodelant le lipidome de différents tissus, et s'ils peuvent agir en activant directement des voies de signalisations (Aluko, 2012; Vázquez *et al.*, 2018). Les lipides bioactifs les plus connus sont les lipides polyinsaturés qui servent de précurseurs à une vaste gamme de facteurs et d'hormones intervenant dans la régulation de la sensibilité à l'insuline, des fonctions inflammatoires et immunitaires, du comportement alimentaire, de la pression artérielle, de la reproduction, et plusieurs autres processus physiologiques. Un peu moins connus que les lipides polyinsaturés mais tout aussi prometteurs par leurs effets sur la santé, les lipides à chaînes moyennes sont des lipides bioactifs à part entière car ils activent directement des voies de signalisations et ils peuvent remodeler significativement le métabolisme à l'échelle des cellules et de l'organisme.

1.8.2.1 Les voies de signalisations activées par les acides gras à chaînes moyennes (MCFA)

Les fonctions signalétiques des MCFA sont médiés, selon les connaissances actuelles, par deux membres de la classe des GPCR, soit le GPR40 et le GPR84 (Pujol *et al.*, 2018; Sundqvist *et al.*, 2018; Suzuki *et al.*, 2013), ainsi que par les PPARs (Malapaka *et al.*, 2012). GPR40 et GPR84 sont alternativement appelés *free fatty acid receptor* (FFAR) 1 et FFAR5. GPR40/FFAR1 est surtout exprimé par le système nerveux central et le pancréas, tandis que GPR84, beaucoup plus répandu dans l'organisme, est exprimé par le système nerveux central, le tractus intestinal, le foie, le cœur, les muscles squelettiques, les cellules lymphocytaires et plusieurs autres organes viscéraux (Miyamoto *et al.*, 2016).

Il est connu depuis plusieurs années que l'activation, par les acides gras de la diète, du récepteur GPR40/FFAR1 est indispensable pour une sécrétion optimale de l'insuline par les cellules pancréatiques β induite en réponse au glucose. Cela était connu pour les acides gras à chaînes longues pour lesquelles ce récepteur a aussi une affinité (Latour *et al.*, 2007). Récemment, il a été découvert qu'une dose physiologique de MCFA, administrée selon un ratio de C8 :10 de 40 :60 (mimant les proportions retrouvées dans les huiles MCT), non seulement potentialiserait la sécrétion d'insuline en réponse au glucose, mais induirait également un regain de la fonction sécrétrice des cellules pancréatiques β issus d'animaux âgés ou préalablement soumis à des traitements lipotoxiques au palmitate (Pujol *et al.*, 2018). L'activation de GPR40/FFAR1 par le C8 se traduirait par l'activation de la phospholipase C- β

induisant l'hydrolyse de PIP2 en IP3 qui, en interagissant avec son propre récepteur du réticulum endoplasmique, induit la libération du Ca2+ dans le cytosol, le signal déclenchant la sécrétion de l'insuline. Ce mécanisme se déroulerait en sus de la voie de sécrétion insulinique induite par le glucose, proposant une base mécanistique intéressante pour expliquer la potentialisation par les MCFA de la sécrétion de l'insuline en réponse au glucose. Dans la même étude, et d'une manière tout à fait novatrice, il a été démontré que cette activation MCFA-dépendante de GPR40/FFAR1 induisait la conversion partielle du C8 et du C10, par les cellules- β elles-mêmes, en corps cétonique 3-hydroxybutyrate dont l'oxydation améliorerait le bilan énergétique, la résistance à la lipotoxicité, et la fonction sécrétrice d'insuline de ces cellules (Pujol *et al.*, 2018). Ces mécanismes montrent à quel point les MCFA sont des lipides bioactifs prometteurs pour la prévention et le traitement du diabète de type 2.

Ouant au GPR84, l'état actuel des connaissances lui attribue un rôle clair dans l'induction de l'inflammation (Sundqvist et al., 2018; Suzuki et al., 2013). Le décanoate hydroxylé et non hydroxylé, de même que les acides gras à 9, 11 et 12 carbones, activent le chimiotactisme des macrophages et des leucocytes polymorphonucléaires rénaux. En outre, le C12 et le 6-n-octylaminouracil, un agoniste synthétique de GPR84 dérivé du C8, amplifient d'une manière dépendante au récepteur GPR84, la sécrétion des facteurs pro-inflammatoires Il-8 et TNF α par ces deux types cellulaires en réponse aux LPS (Suzuki et al., 2013). Récemment, il a été suggéré que *via* une voie de signalisation dépendante de la phospholipase, identique à celle décrite plus haut pour GPR40/FFAR1, l'activation du GPR84 à la surface des neutrophiles par des ligands synthétiques dérivés des MCFA se traduit par une élévation du Ca²⁺ cytosolique suivie d'une légère hausse de la sécrétion de ROS par la NADH-oxydase (Sundqvist et al., 2018). Or, la libération des ROS dans leur microenvironnement consiste en la principale fonction inflammatoire antimicrobienne des neutrophiles (Nguyen et al., 2017). Il convient de souligner, toutefois, que cette libération de ROS était relativement mineure et que cela suggère que l'éventuel potentiel proinflammatoire des MCFA est relativement faible par rapport aux LCFA.

Il est donc fort possible que les MCFA, par leur capacité à activer aussi bien GPR40/FFAR1 que GPR84, puissent avoir à la fois des effets bénéfiques pour la santé métabolique et des effets aggravants vis-à-vis des inflammations chroniques de bas grade en lien avec des troubles métaboliques comme l'obésité, la NAFLD et la dysbiose intestinale. L'ambiguïté des effets bioactifs des lipides à chaînes moyennes, dont il faudra absolument prendre compte pour les études à venir, est parfaitement illustrée par une récente étude menée par Guimarães et al. (2019) sur des rats. Cette étude révèle qu'au niveau hépatique, une diète enrichie en MCT induit la hausse significative de l'expression des gènes inflammatoires TNF α et Il-6 tout en stimulant l'expression des gènes de la β -oxydation et de la thermogenèse, et qu'une supplémentation en MCT échoue totalement à résorber la stéatohépatite induite par une diète riche en fructose (Guimarães et al., 2019). Toutefois, des résultats contradictoires ont été publiés par d'autres équipes qui ont plutôt attribué aux MCT des effets anti-inflammatoires. Par exemple, Geng et ses collaborateurs (2016) ont démontré que le remplacement de la portion de lard par une huile MCT dans une diète grasse (17% MCT et 3% huile de maïs, au lieu de 17% lard et 3% huile de maïs, masse/masse) empêchait l'élévation des niveaux circulants de la cytokine pro-inflammatoire II-6, augmentait les niveaux circulants de la cytokine anti-inflammatoire Il-10, et prévenait l'induction des marqueurs pro-inflammatoires NF-kB, cyclooxygénase 2 et la synthétase des oxydes nitriques (Geng et al., 2016). L'effet des MCT sur l'inflammation demeure donc non résolu. Il semblerait, à la lumière de ces études, que les MCT administrés seuls ou via des diètes riches en gras soient sans danger voire bénéfique d'un point de vue de l'inflammation. En revanche, ils causeraient de l'inflammation lorsqu'ils sont administrés avec de fortes doses de fructose.

Les MCFA, et tout particulièrement le C8 et le C10, se lient aussi au *ligand binding* pocket de PPAR γ et l'activent partiellement, aboutissant à l'induction (moins efficacement que le rosiglitazone toutefois) de l'expression des gènes métaboliques cibles de PPAR γ comme *CEBPA*, *SREBP1* et *FABP4*, d'après des expériences réalisées *in-vitro* sur des cellules 3T3-L1 différentiées en préadipocytes (Liberato *et al.*, 2012b; Malapaka *et al.*, 2012). Le C10 est même capable d'antagoniser la liaison du rosiglitazone (Liberato *et al.*, 2012b). En d'autres termes, bien que les MCFA sont des agonistes de PPAR γ , ils en activent que faiblement l'action adipogène. Cela serait dû à la différence entre le mode de liaison des MCFA et celui du rosiglitazone à la *ligand binding pocket*, faisant des MCFA des ligands moins stables (Liberato *et al.*, 2012b). Les MCFA ont aussi la capacité de se lier avec une affinité relativement faible au PPAR α et au PPAR β (Malapaka *et al.*, 2012), mais les effets de ces liaisons sur l'homéostasie cellulaire et physiologique n'ont pas été étudiés à ce jour.

1.8.2.2 Les effets métaboliques des lipides à chaînes moyennes

Une étude précédemment publiée par notre équipe a permis de démontrer que le C6 et le C8 sous forme de MCFA inhibaient significativement, sur des cultures primaires d'hépatocytes d'embryons de poulet, l'activité de l'enzyme FASN induite de façon synergique par l'insuline et l'hormone T3 (Akpa et al., 2010). Pour rappel, les hormones thyroïdiennes, dont la T3, sont censées favoriser l'expression des gènes lipogéniques comme FASN (Radenne et al., 2008). En outre, il a été montré dans des hépatocytes aviaires et des cellules HepG2, que le C6 et le C8 inhibaient au niveau transcriptionnel l'expression de l'enzyme FASN (Akpa et al., 2010) de même que celle de l'enzyme ACC et de l'enzyme malique (EM) (Goodridge et al., 1998; Roncero & Goodridge, 1992; Thurmond et al., 1998). Plus récemment, une étude publiée par Wang et ses collaborateurs a aussi démontré que le C8 :0 et le C10 :0 exerçaient des effets anti-lipogéniques et anti-stéatogènes dans des hépatocytes en cultures (Wang et al., 2016a). L'étude a démontré que ces deux types de MCFA induisaient une hausse de l'expression des enzymes cataboliques ATGL et HSL concomitante à une baisse de l'expression des gènes anaboliques LXR-a, SREBP-1, ACC, FASN, CD36 et LPL, dans des cellules exposées à des doses lipotoxiques de LCFA (Wang et al., 2016a). Une des premières études fondatrices pour la recherche du potentiel métaboliquement bénéfique des MCT fut celle proposée par Lieber et ses collaborateurs en 1967 (Lieber

et al., 1967). Ces auteurs observèrent que le remplacement des LCT par des MCT (essentiellement à base d'octanoate), dans la diète de rats soumis à une consommation prolongée d'alcool, induisit une atténuation des symptômes de la stéatose alcoolique (AFLD), ainsi qu'une diminution de la synthèse des triglycérides et de l'adiposité, et une activation de l'oxydation des lipides (Lieber *et al.*, 1967). Depuis lors, de nombreuses études se sont succédé en vue d'explorer la reproductibilité de tels effets métaboliques et leur applicabilité à la lutte contre les maladies métaboliques comme l'obésité et la NAFLD résultant d'une accumulation délétère de lipides (Marten *et al.*, 2006; Rial *et al.*, 2016b), chez les animaux aussi bien que chez les humains. De surcroit, il est intéressant de mentionner que la consommation des MCT comme additifs et comme suppléments alimentaires est officiellement reconnue pour son innocuité par l'agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux (FDA) depuis 1994 (Marten *et al.*, 2006; Traul *et al.*, 2000).

Des études ont aussi montré que l'administration, à des rats sains, de diètes à long terme enrichies en MCT, à l'inverse des diètes isocaloriques enrichies en LCT, se traduisait par une diminution importante la déposition des graisses et de la masse corporelle, sans impliquer de carences alimentaires en protéines (Ling *et al.*, 1986). Par ailleurs, l'administration, par gavage, d'une dose unique de 1g de MCT/animal à des rats Wistar (des modèles animaux fiables pour les études métaboliques), en comparaison avec une administration similaire de LCT, induisit une hausse significative de la consommation d'énergie et de la thermogenèse suggérant un effet sur le catabolisme des lipides (Noguchi *et al.*, 2002). Les auteurs de la même étude ont dans le même temps démontré que les rats soumis à une diète prolongée avec 10% de MCT, à l'inverse de ceux soumis à diète isocalorique à base de LCT, démontrèrent une réduction de leur masse graisseuse totale, et de leurs masses de tissus adipeux sous-cutanés et viscéraux (Noguchi *et al.*, 2002).

Le métabolisme des lipides à chaînes moyennes est décrit depuis plusieurs décennies comme étant différent de celui des lipides à chaînes longues. En bref, au niveau intestinal, les MCT de la diète sont beaucoup plus solubles que les LCT et leur hydrolyse par les lipases du système digestive est beaucoup plus efficace que celle des LCT. Les MCFA issus de cette hydrolyse, au contraire des LCFA, sont absorbés par l'intestin puis dirigés exclusivement vers la circulation porte hépatique, par diffusion simple, indépendamment des voies classiques de rééstérification et d'incorporation dans les chylomicrons. Au niveau hépatique, les MCFA sont faiblement rééstérifiés, s'accumulent relativement peu dans les gouttelettes lipidiques (comparés aux LCFA) et sont davantage oxydés en vue de générer de l'ATP et des corps cétoniques. Les MCFA favorisent donc les voies oxydatives libérant l'énergie chimique qu'ils renferment, au dépend l'anabolisme des lipides. Pour l'ensemble des ces raisons, il a souvent été suggéré que la consommation des lipides à chaînes moyennes, associée à une réduction de la consommation des lipides à chaînes longues, pourrait représenter une stratégie nutritionnelle intéressante pour contribuer à enrayer l'obésité, la NAFLD, et les symptômes associés.

Dans cet ordre d'idées, il a été démontré que des diètes grasses enrichies en MCT plutôt qu'en LCT prévenaient la prise de masse corporelle et la dyslipidémie, empêchaient l'expansion adipeuse, réduisaient l'obésité, et induisaient l'expression des gènes lipolytiques HSL et ATGL dans le tissu adipeux blanc, et l'expression du gène UCP1 ainsi que des gènes lipolytiques dans le tissu adipeux brun (Kim et al., 2017; Zhang et al., 2015). Zhang et al. (2015) ont découvert que les diètes riches en MCT sensibilisaient le tissu adipeux brun à l'activité de la voie β_3 -adrénergique, une des principales voies responsables de l'activation de la lipolyse et du processus de la thermogenèse. Ces découvertes récentes, associées aux plus anciennes, suggèrent que les lipides à chaînes moyennes ont la capacité d'accroitre la dépense énergétique totale augmentant notamment la thermogenèse postprandiale, contribuant au en rétablissement d'une balance catabolique favorable à une réduction des risques d'obésité. Par ailleurs, il a été suggéré que les MCT exercent des effets bénéfiques sur la santé métabolique aussi en modulant les effets de l'endotoxémie, le marqueur clef de la dysbiose intestinale. En effet, l'administration quotidienne de MCT, contrairement à l'administration de LCT, a réduit significativement la capacité des LPS

(administrés par une voie exogène) à activer les fonctions pro-inflammatoires des cellules de Kupffer hépatiques et à altérer l'intégrité de la barrière intestinale (Kono *et al.*, 2003b). Le mécanisme sous-jacent précis n'est pas connu.

Chez des humains adultes en bonne santé, Kasaï et ses collaborateurs observèrent que la consommation quotidienne pendant 12 semaines, de 14g de triglycérides structurés, des triglycérides contenant 2 LCFA et 1 MCFA, produits par la transférification des MCT et des LCT (MLCT), induisait de légères mais significatives chutes de la masse corporelle, de l'adiposité viscérale et sous-cutanée, et de la cholestérolémie, sans affecter davantage de paramètres anthropométriques (Kasai et al., 2003). En adéquation avec ces études, des résultats prometteurs ont également été observés chez des sujets en surpoids. La prescription à ces derniers, dans le cadre d'études cliniques randomisées, de MCT sous forme de suppléments ou d'additifs alimentaires, ou encore sous forme d'huile de noix de coco, fut accompagnée d'une hausse de la consommation d'oxygène postprandiale, de la thermogenèse, le tout associé à une diminution de la masse corporelle, du tour de taille et l'adiposité générale (Assuncao et al., 2009; St-Onge et al., 2003a; St-Onge et al., 2003c). De surcroit, la consommation de MCT d'huiles de noix de coco, à l'inverse d'huiles enrichies en LCT longuement documentées pour leurs effets néfastes sur le profil cardiovasculaire, est réputée prévenir l'élévation de la triglycéridémie tout en diminuant le cholestérol total ainsi que le ratio cholestérol LDL :HDL (Assuncao et al., 2009; St-Onge et al., 2003b; St-Onge *et al.*, 2014a).

1.9 Problématique et objectifs

La consommation chronique des lipides à chaînes longues chez les humains aussi bien que chez les animaux de laboratoire, *via* des diètes riches en gras et des diètes riches en gras et en glucides, induit une balance énergétique positive. Cette dernière favorise la progression de l'obésité, de la résistance à l'insuline et des symptômes typiques de la NAFLD. Plusieurs études ont démontré, chez l'humain, que la consommation des MCT accroissait la dépense énergétique post-prandiale, prévenait la hausse des niveaux circulants des triglycérides et du cholestérol, et réduisait légèrement mais significativement l'adiposité viscérale et sous-cutanée. Mais les études conduites chez les humains ne sont jamais plus longues que quelques semaines, et l'effet d'une consommation prolongée des MCT sur la santé métabolique n'est pas connu. Chez des animaux, il a été observé que des diètes grasses chargées en MCT plutôt qu'en LCT promouvaient un balance catabolique associée à une moindre accumulation des réserves lipidiques dans le foie et dans le tissu adipeux, et une thermogenèse accrue au niveau des tissus adipeux brun et blanc. Toutefois, des études contradictoires ont quant à elles suggéré que la consommation des MCT pouvait être délétère pour le foie en y promouvant l'accumulation des triglycérides, voire même l'inflammation. Il demeure donc intéressant de clarifier ce fait.

En outre, les MCFA sont des lipides bioactifs en ce sens qu'ils sont les ligands naturels de plusieurs récepteurs, dont des PPARs, le GPCR40/FFAR1 et le GPR84. Cela confère donc théoriquement aux MCFA la capacité de moduler une grande variété de processus métaboliques et immunitaires. Cela pourrait expliquer la complexité et l'ambiguïté des effets des MCT constatés lors de protocoles de diètes prolongées chez les animaux.

L'ensemble de ces travaux et de ces considérations nous ont conduits à atteindre deux objectifs généraux pour une meilleure compréhension des effets des lipides à chaînes moyennes sur la santé métabolique. Le premier objectif, décliné dans le chapitre II de cette thèse, visait à déterminer clairement si les MCFA exerçaient des effets positifs ou négatifs sur les hépatocytes, en comparaison avec un LCFA (le palmitate) qui, lui, est largement documenté comme étant lipotoxique. Le second objectif, décliné dans le chapitre III de la thèse, visait à vérifier clairement si le remplacement des LCT d'une diète obésogène par des MCT était une stratégie efficace pour prévenir la progression de l'obésité, de la NAFLD et de la résistance à l'insuline d'une part, mais aussi pour traiter ces maladies lorsqu'elles étaient déjà établies. Pour pousser l'étude plus loin

qu'une simple confirmation d'un consensus qui grandissait déjà au moment où elle était réalisée, nous avons également atteint un objectif secondaire plus fondamental. Ce dernier consistait à examiner l'implication de deux récepteurs connus des MCFA, PPARγ et GPR40/FFAR1, dans l'induction des voies cataboliques par les MCFA au niveau du foie, le principal organe de destination des MCFA issus de la diète. L'idée était de déterminer à quel point le foie était un organe central dans la réalisation des fonctions bioactives cataboliques des lipides à chaînes moyennes.

En bref, les travaux présentés dans cette thèse démontrent que les lipides à chaînes moyennes n'ont aucun potentiel lipotoxique et que, lorsqu'ils sont administrés *via* des diètes grasses hautement caloriques, ils ont le non seulement le potentiel de prévenir la progression de l'obésité, de la stéatose hépatique et de la résistance à l'insuline, mais aussi de réduire ces trois troubles métaboliques, chez des souris. Nos travaux suggèrent, en complément, que ces effets bénéfiques ne sont pas simplement le fait de la haute propension des lipides à chaînes moyennes à être catabolisés, mais résultent aussi (au moins en partie) de leur action bioactive directe sur le foie. Via un mécanisme dépendant du GPR40/FFAR1, les MCFA activent fortement le potentiel du foie à réaliser la thermogenèse, un processus catabolique extrêmement efficace pour réduire les réserves lipidiques de l'organisme.

NOTE : Dans un souci d'économie d'espace et de clarté, les références de chacun des chapitres et des annexes apparaissent seulement dans la section des références globales à la fin de la thèse.

CHAPITRE II

L'INNOCUITÉ DES ACIDES GRAS À CHAÎNES MOYENNES VIS-À-VIS DES HÉPATOCYTES

HEXANOIC, OCTANOIC AND DECANOIC ACIDS PROMOTE BASAL AND INSULIN-INDUCED PHOSPHORYLATION OF THE AKT-MTOR AXIS AND A BALANCED LIPID METABOLISM IN THE HEPG2 HEPATOMA CELL LINE

Sabri Ahmed Rial, Gaetan Ravaut, Tommy B. Malaret, Karl-F. Bergeron and Catherine Mounier

Molecules (MDPI). 2018 September 11; 23(9)

Avant propos

La réalisation de ce chapitre a été initiée en vue de définir clairement l'impact des lipides à chaînes moyennes sur les hépatocytes, après que des études contradictoires eurent été publiées, une majorité suggérant un effet hépatoprotecteur (Lieber *et al.*, 1967; Ronis *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2016a; Zhang *et al.*, 2016), d'autres (plus ou moins récentes) suggérant au contraire un effet stéatogène délétère (Chamma *et al.*, 2017; De Vogel-van den Bosch *et al.*, 2011) de la part de diètes riches en MCT. Pour ce faire, nous avons réalisé des expositions prolongées, à des doses correspondant aux lipémies postprandiales, de cellules hépatocytaires humaines de la lignée HepG2

soit aux MCFA seuls, à savoir l'hexanoate (C6), l'octanoate (C8) ou le décanoate (C10), soit à une combinaison équimolaire de C8 et de C10 (C8+C10) mimant les sources commerciales d'huiles MCT. En guise de contrôle positif de l'induction de la stéatose et de la lipotoxicité, nous avons traité des cellules au palmitate à des doses équivalentes. Le potentiel lipotoxique de ces traitements a été évalué par l'analyse de la viabilité cellulaire et de l'intégrité du potentiel de membrane mitochondrial. Le potentiel stéatogène a été déterminé en fonction de l'impact sur l'accumulation des gouttelettes lipidiques, l'expression des gènes clefs de la DNL, et le niveau d'oxydation des lipides. Quant à l'impact sur la sensibilité des hépatocytes à l'insuline, un des principaux paramètres à être altéré par la stéatose et la lipotoxicité, il a été déterminé par la mesure du taux de captation du (³H)-désoxy-D-glucose en réponse à l'insuline, et par la mesure des niveaux de phosphorylation des protéines AKT (Ser473) et mTOR (Ser2448) en absence et en présence d'insuline.

Cette étude nous a permis de démontrer clairement qu'à des doses - correspondant à des concentrations physiologiques en cas de maladies métaboliques - où le palmitate induit une mortalité cellulaire et des dommages mitochondriaux massifs, une forte induction du nombre et de la taille des gouttelettes lipidiques, un débalancement anabolique et une forte résistance à l'insuline, les MCFA seuls ou en combinaisons n'induisent ni lipotoxicité ni accumulation excessive des réserves lipidiques. En outre,

les traitements aux MCFA tendent même à préserver une balance métabolique « normale » voire même à stimuler l'expression du gène clef de la β -oxydation, *CPT1A*. Plus intéressant encore, les traitements aux MCFA n'inhibent pas la réponse cellulaire normale à l'insuline, et accroissent (tous) significativement les niveaux de phosphorylation de la kinase mTOR en réponse à l'insuline.

Ces résultats encore novateurs au moment où ils étaient générés, à présent publiés, s'ajoutent à d'autres résultats similaires de la littérature pour s'inscrire dans un consensus grandissant selon lequel les MCFA, à l'exact opposé des LCFA, préviennent la progression de la stéatose hépatique et de ses complications, et peuvent même améliorer la sensibilité à l'insuline hépatique et donc physiologique étant donné l'implication du tissu hépatique dans la réponse physiologique à l'insuline.

J'ai personnellement été impliqué dans tous les aspects de ces travaux, qui s'inscrivaient dans la continuité de mon mémoire de maîtrise (Rial, 2015), incluant l'élaboration des hypothèses de recherches, des protocoles expérimentaux, la collecte et l'analyse des résultats, puis la rédaction de la publication scientifique présentée dans ce qui suit. Chacune de ces étapes a été pensée, corrigée et discutée avec les docteurs Catherine Mounier et Karl-Frédérik Bergeron qui m'ont supervisé tout le long.

2.1 Résumé

Les maladies métaboliques comme la stéatose hépatique non alcoolique (NAFLD) connaissent des prévalences alarmantes à travers le monde. Les acides gras à longues chaînes (LCFA), des lipides qui composent la vaste majorité des graisses alimentaires les plus communément consommées, figurent parmi les aliments aux plus forts potentiels obésogène et stéatogène. La stéatose hépatique est un syndrome associé à plusieurs complications physiologiques. La résistance à l'insuline en fait partie. Un nombre croissant d'études scientifiques semble désigner les acides gras à chaînes movennes (MCFA), des lipides qui subissent le catabolisme plus efficacement que les LCFA, comme une alternative nutritionnelle prometteuse dans la prévention de la *NAFLD*. Toutefois, une certaine controverse, nourrie de récentes parutions, persiste quant à l'innocuité des MCFA sur la santé hépatique. Dans la présente étude, des cellules d'hépatocarcinome humaines de la lignée HepG2 ont été exposées à une concentration de 0,25mM d'acide hexanoïque (C6), d'acide octanoïque (C8), d'acide décanoïque (C10) ou d'un mélange équimolaire de C8 et de C10. Le dernier mélange servait à mimer l'apport en MCFA des huiles MCT commerciales. Il a été mis en évidence que le C6, un MCFA trop peu étudié, à l'instar du C8 et du C10, ne stimulent pas les voies anaboliques lipidiques, contrairement au LCFA de type palmitate. À l'inverse, les MCFA ont plutôt promu une plus grande balance catabolique que le palmitate, et ont prévenu la lipotoxicité. Dans le même temps, l'intégrité mitochondriale fut préservée par les MCFA. Toutefois, il a été constaté que le traitement au C8 a induit une légère chute du potentiel de membrane mitochondriale, suggérant qu'une exposition prolongée des hépatocytes au C8 pourrait se traduire par des effets cytotoxiques. Enfin, l'exposition aux MCFA a non seulement préservé la réponse fonctionnelle des hépatocytes à l'insuline, mais elle s'est également traduite par une hausse de la phosphorylation insulinodépendante de la voie moléculaire AKTmTOR. En conclusion, les MCFA représentent bel et bien une alternative nutritionnelle efficace pour la prévention de la stéatose hépatique et de la résistance à l'insuline hépatique.

Mots clefs : Acides gras à chaînes moyennes (*MCFA*), acides gras à chaînes moyennes (*AGCM*), métabolisme des lipides, hépatocytes, lipotoxicité, résistance à l'insuline.

2.2 Abstract

Metabolic illnesses such as non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) are in constant increase worldwide. Highly consumed long chain fatty acids (LCFA) are among the most obesogenic and steatogenic nutrients. Hepatic steatosis is associated with several complications such as insulin resistance. Growing evidence points to medium chain fatty acids (MCFA), more efficiently oxidized than LCFA, as a promising dietary alternative against NAFLD. However, reports on the hepatic effects of MCFA are sometimes conflicting. In this study we exposed HepG2 cells, a human hepatocellular model, to 0.25 mM of hexanoic (C6), or octanoic (C8), and decanoic (C10) acids separately or in a C8 + C10 equimolar mix reflecting commercially available MCFArich oils. We found that C6, a poorly studied MCFA, as well as C8 and C10 did not provoke the deleterious lipid anabolism runaway typically induced by LCFA palmitate. MCFA tended, instead, to promote a balanced metabolic profile and were generally non-cytotoxic. Accordingly, mitochondrial integrity was mostly preserved following MCFA treatment. However, treatments with C8 induced a mitochondrial membrane potential decrease, suggesting prolonged exposure to this lipid could be problematic. Finally, MCFA treatments maintained optimal insulin sensitivity and even fostered basal and insulin-dependent phosphorylation of the AKT-mTOR pathway. Overall, MCFA could constitute an effective nutritional tool to manage liver steatosis and hepatic insulin resistance.

Keywords: medium chain fatty acids (MCFA); long chain fatty acids (LCFA); lipid metabolism; hepatocytes; lipotoxicity; insulin resistance

2.3 Introduction

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is the most widespread chronic liver illness with a prevalence reaching 20–30% within the general population and 80–90% among obese patients (Dumitrascu & Neuman, 2018; Ofosu *et al.*, 2018). In addition to consequences directly related to liver dysfunction, NAFLD is closely associated with several pathologies including metabolic syndrome, obesity, cardiovascular disease, insulin resistance, and type 2 diabetes (Al-Dayyat *et al.*, 2018b; Ofosu *et al.*, 2018). Hepatic steatosis, the excessive accumulation of triglycerides (TG) within the liver, is the major hallmark of NAFLD. Liver steatosis is characterized by the intracellular accumulation of lipid droplets (LD) in more than 5% of cytoplasmic space (Al-Dayyat *et al.*, 2018b; Cohen *et al.*, 2011; Lounis *et al.*, 2015b). At the molecular level, the pathogenesis of NAFLD is largely due to lipotoxicity (Berlanga *et al.*, 2014a; Engin, 2017b). Triglyceride accumulation in the core of LD is correlated to the intracellular accumulation of non-esterified free fatty acids and of several lipid species that are potent inducers of lipotoxicity in the liver (Berlanga *et al.*, 2014a; Engin, 2017b; Feldstein *et al.*, 2004; Tamura & Shimomura, 2005).

Long chain fatty acids (LCFA) can trigger variable degrees of lipotoxicity depending on their saturation levels (Chen *et al.*, 2018; Perez-Martinez *et al.*, 2010). Saturated LCFA are the most lipotoxic. Palmitate is a 16-carbon long saturated LCFA well documented to induce markers of de novo lipogenesis, excessive LD accumulation, massive lipotoxicity, and insulin resistance in hepatocytes (Gao *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2018; Tang *et al.*, 2015; Xiao *et al.*, 2017; Zhao *et al.*, 2017). LCFA impede lipid oxidation and enhance reactive oxygen species (ROS) accumulation, promoting mitochondrial injury, oxidative stress, inflammation, apoptosis and necrosis (Neuschwander-Tetri, 2010). Mediators of oxidative stress and inflammation exacerbate ROS accumulation and mitochondrial damages (Gao *et al.*, 2010; Han & Kaplowitz, 2015; Neuschwander-Tetri, 2010), and directly inhibit the activity of the insulin receptor and its substrate (Capeau, 2003; Li & Yu, 2013; Wang *et al.*, 2015a). Lipogenesis, combined with diminished lipid catabolic activity, contribute to a steatogenic metabolic imbalance in LCFA-treated cells.

Medium chain fatty acids (MCFA) are saturated fatty acids with chain lengths of six to ten carbons (Babayan, 1987; Bach & Babayan, 1982; Eyres et al., 2016). Hexanoic (C6), octanoic (C8), and decanoic (C10) acids are naturally found in coconut, palm kernel, and babassu oils where they account for around 8–18% of total fatty acids (Babayan, 1987; Bach & Babayan, 1982; Eyres et al., 2016). Concentrated formulas, like commercially available medium chain TG (MCT) oils, consist essentially of equimolar amounts of esterified C8 and C10, with very small amounts of C6 (Eyres et al., 2016). Because of their relatively short carbon chain length, once assimilated by organisms, MCFA undergo a distinctive metabolism compared to LCFA (Papamandjaris et al., 1998). Dietary MCFA are transported to the liver via the hepatic portal blood system independently of chylomicron trafficking, and their translocation across mitochondrial membranes is not rate-limited by the carnitine palmitoyltransferase (CPT) system (Papamandjaris et al., 1998; Schönfeld & Wojtczak, 2016). These properties suggest that MCFA are mainly metabolized by the liver, where they preferentially undergo mitochondrial β -oxidation instead of reesterification (Papamandjaris et al., 1998; Schönfeld & Wojtczak, 2016). This is supported by human trials showing that MCT intake increases postprandial oxygen consumption, energy expenditure, and fat oxidation, while improving dyslipidemia and, in some cases, adiposity (Dulloo et al., 1996; Hill et al., 1989; Rial et al., 2016b; Scalfi et al., 1991; Seaton et al., 1986; St-Onge & Jones, 2003; St-Onge et al., 2014a; St-Onge et al., 2003c). Several molecular and animal physiology studies also support these observations. In a previous study performed on chick embryos and HepG2 hepatocytes, our team found that both C6 and C8 decreased insulin and triiodothyronine-induced fatty acid synthase (FASN) expression and activity (Akpa et al., 2010), a key enzyme in de novo lipogenesis (Strable & Ntambi, 2010). In L02 hepatocytes, C8 and C10 triggered less TG accumulation than LCFA. This was associated with a downregulation of the expression of key lipogenic players and an

upregulation of lipolysis markers (Wang *et al.*, 2016a). In addition, C8 and C10 did not induce the substantial inflammation caused by LCFA (Li *et al.*, 2016a). Similarly, high fat diets (HFD) rich in MCT did not induce obesity, insulin resistance or inflammation in mice, contrary to lard-based HFD (Geng *et al.*, 2016). Moreover, MCT reduced steatosis and necrosis in a rat NAFLD model (Ronis *et al.*, 2013).

However, less promising and sometimes conflicting results have also been reported. Mice fed an MCT-rich diet, despite exhibiting less hepatic and muscular steatosis than long chain TG-fed mice, displayed increased insulin resistance as revealed by a lowered glucose infusion rate during hyperinsulinemic euglycemic clamp (De Vogelvan den Bosch *et al.*, 2011). The underlying mechanisms for this surprising effect are poorly understood but probably exclude pancreatic toxicity since MCFA improved β -cell functions both in vitro and in vivo (Pujol *et al.*, 2018). In another mouse study, long-term feeding with high MCT doses led to liver steatosis, marked lipogenesis, and downregulation of β -oxidation markers, as well as mild improvement of both body mass and insulin sensitivity (Chamma *et al.*, 2017). Hence, more studies are needed to better understand the impact of MCFA on intracellular lipid accumulation and cellular responses to insulin.

In this study, we mimicked hepatic exposure to various fatty acids by treating HepG2 cells with MCFA. C8 and C10 were administered separately or in an equimolar mix reflecting the composition of commercially available MCT oils. We also tested C6, an understudied MCFA with potent antilipogenic properties (Geng *et al.*, 2016). Though C8 had some impact on mitochondrial integrity, MCFA treatment did not trigger intracellular lipid accumulation or cytotoxicity. MCFA seemed instead to sustain a relative metabolic balance favoring lipid catabolism. Finally, MCFA did not impair insulin sensitivity of hepatocytes and even significantly enhanced the basal phosphorylation state of protein kinase B/AKT kinase (commonly known as AKT).

2.4 Materials and methods

2.4.1 Cells, chemicals and reagents

HepG2 cells were purchased from American Type Culture Collection (ATCC, #HB-8065). Dulbecco's phosphate-buffered saline 1X (DPBS, #14190250), fetal bovine serum (FBS, #16000044), penicillin/streptomycin (#15140122) (10,000 U/mL and 10,000 μ g/mL respectively), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) Vybrant assay kit (#V13154), JC-1 dye (5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethyl-imidacarbocyanine-iodide,5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-

tetraethylbenzimidazolocarbocyanine iodide) (#T3168), DAPI histone-stain dye (2-(4-Amidinophenyl)-6-indolecarbamidine dihydrochloride, 4',6-Diamidino-2phenylindole dihydrochloride) (#D1306), BODIPY 493/503 lysochrome (#D3922), Trizol reagent (#15596026), and SuperScriptII RNA Reverse Transcriptase kit (#18064014), were purchased from ThermoFischer Scientific. The SensiFAST SYBR real-time PCR kit was purchased from Bioline (#BIO-98005). Poly-L-lysine solution (#P4707), oleic acid (oleate, #O1008), palmitic acid sodium salt (palmitate, # P9767), hexanoic acid sodium salt (C6; #C4026), octanoic acid sodium salt (C8; #C5038), decanoic acid sodium salt (C10; #C4151), and fatty acid-free bovine serum albumin (BSA; #A8806-1G) were purchased from Sigma Aldrich (Saint Louis, MO, USA). Recombinant human insulin (#511-016-CM), Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM; 25 mM D-glucose) (#319-005-CL), and Eagle's minimum essential medium (EMEM; 5.5 mM D-glucose) supplemented with Earle's salts and L-glutamine (#320-005-CL), were purchased from Wisent Bioproducts (Saint Jean Baptiste, QC, Canada). Radiolabeled [1-14C]-oleate (#NEC317050UC) and 2-[1,2-3H(N)]-deoxy-D-glucose (#NET549250UC) were purchased from PerkinElmer (Waltham, MA, USA).

2.4.2 Fatty acid conjugation to bovine serum albumin

Stocks of bovine serum albumin (BSA)-conjugated fatty acids at a 6:1 molar ratio (10 mM fatty acid: 1.7 mM BSA) were prepared as follows. Powdered palmitate (0.7%, w:v) was dissolved in 150 mM NaCl at 70 °C until the solution became clear (~1 h). Solutions of C6, C8, and C10 at 10 mM were obtained following the same procedure, except that their dissolution in 150 mM NaCl was achieved at 37 °C. Fatty-acid free BSA (0.12%, w:v) was dissolved in 150 mM NaCl at 37 °C. These fatty acids and BSA solutions were then slowly mixed at a 1:1 volume ratio and stirred 1 h at 37 °C, pH was adjusted to 7.4, and the final stock solutions were sterile-filtered.

2.4.3 Cell culture

Unless otherwise stated, HepG2 human hepatocellular carcinoma cells were seeded in regular non-pyrogenic plates at 5.2×104 cells/cm2 and cultivated in EMEM supplemented with fetal bovine serum (FBS,10%), penicillin (100 U/mL) and streptomycin (100 µg/mL) under standard conditions (37 °C, 5% CO2) until cells reached ~80% confluence. Cells were then transferred FBS-free EMEM and starved 24 h before a 24 h treatment with either palmitate, C6, C8, C10 or an equimolar mix of C8 + C10.

2.4.4 MTT cell viability assay

Cell viability was assessed by the reduction of yellow water-soluble tetrazolium salt into the blue non-water-soluble formazan (Mosmann, 1983; Senthilraja & Kathiresan, 2015). Treated cells were exposed to FBS-free EMEM supplemented with 1.2 mM MTT reagent for 3 h at 37 °C. A lysis solution (10% SDS, 0.01 mM HCl) was mixed into the medium and plates were incubated 4 h at 37 °C. The absorbance of cell lysates (570 nm) was measured using the BioTek Gen5 software and the Eon Biotek plate

reader. Viability percentage was calculated by reporting the absorbance of a fatty acid treated sample with the absorbance of a corresponding BSA-treated sample.

2.4.5 Mitochondrial membrane potential measurment

The JC-1 dye was used to evaluate the mitochondrial integrity of HepG2 cells. Fluorescence emission at 585 nm is indicative of JC-1 aggregation and optimal mitochondrial membrane potential (Perelman *et al.*, 2012; Smiley *et al.*, 1991). Fatty acid-treated cells were resuspended in prewarmed EMEM at 2.5×10^5 cells/mL supplemented with JC-1 dye (1 µg/mL). After 30 min of incubation at 37 °C in the dark, cells were centrifuged (3 min, 150 g) and resuspended again in EMEM, then processed through a BD Facs Jazz cell sorter using an excitation laser at 488 nm. Fluorescence intensity at 585 nm (5000 events) was considered proportional to mitochondrial membrane potential integrity.

2.4.6 Lipid droplet staining

HepG2 cells grown on poly-L-lysine coated slides were washed with ice-cold DPBS and fixed in 3% paraformaldehyde for 30 min at room temperature. Cells were then treated 10 min with a 120 mM NaCl solution containing both 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (1 μ g/mL) and 4,4-Difluoro-1,3,5,7,8-Pentamethyl-4-Bora-3a,4a-Diaza-s-Indacene (BODIPY 493/503) (1 μ g/mL) for nuclei and LD staining, respectively. Fluorescence was visualized with a Nikon A1 confocal microscope, and image stacks covering the entire cell thickness (z-axis) were taken using the NIS Element software. Finally, image stack projections were analyzed with FIJI software to count nuclei and to measure LD number and size (μ m2).

2.4.7 Western blot analysis

Cells were washed with ice-cold DPBS and total proteins were extracted using radioimmunoprecipitation assay RIPA (RIPA) buffer (50 mM Hepes, 125 mM NaCl, 100 mM NaF, 10 mM Na-pyrophosphate, 10%glycerol, 1%Triton X-100, 1.5 mM MgCl₂, 1 mM ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetra acetic acid (EGTA), 2 mM Na-orthovanadate, 1.5 mM PMSF, 1× cOmpete protease inhibitors, pH7.2). Protein concentration was determined by the Bradford method (Bradford, 1976), then diluted at 1 μ g/ μ L in Laemmli buffer (50 mM Tris-HCl at pH6.8, 5% β-mercaptoethanol, 2% SDS, 0.01% bromophenol blue, 10% glycerol) before denaturation by heating of 5 min at 95 °C. Ten μ g of denatured proteins were loaded onto sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), and immunoblot analyses were carried out using the primary antibodies listed in Table 1. Horseradish peroxidase (HRP)-conjugated anti-rabbit IgG (Abcam, #ab6721) was used as secondary antibody at 1:5000. Bands were visualized with a chemiluminescent HRP substrate (Millipore, WBKLS0500). Bands intensities were measured by densitometric analysis using FIJI software.

2.4.8 Quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis

Total cellular RNA was extracted using the Trizol reagent, following the manufacturer's instructions. Subsequently, 1 μ g of total RNA was reverse-transcribed into cDNA using the SuperScript II kit before quantitative PCR analysis using the SensiFAST SYBR real-time PCR kit and the LightCycler 480 Real-Time PCR System (Roche Applied Science, Laval, QC, Canada). Metabolic genes of interest and the *HPRT1* house-keeping gene were amplified with the primers listed in Table 2. To avoid amplification of genomic DNA, primer pairs were systematically designed to span at least one intron. Gene expression was calculated based on the comparative Δ Ct method.

2.4.9 Oleate oxidation assay

The oxidation rate of radiolabeled [¹⁴C]-oleate into ¹⁴CO₂ was measured as previously described (Amengual *et al.*, 2012; Guo *et al.*, 2006), with minor modifications. Briefly, cells were seeded in 6-well plates at 5.2×10^4 cells/cm², then treated 24 h with fatty acids once reaching 80% of confluency. Afterward, cells were exposed 1 h to preincubation buffer (DMEM containing 12 mM D-glucose, 4 mM glutamine, 25 mM Hepes, 1% fatty acid-free BSA, 0.25 mM oleate). The preincubation buffer was then supplemented with (¹⁴C)-oleate (1 µCi/mL and a small disk of Whatman paper #3 (3.5 mm) wetted with 3 M NaOH was affixed to the top of the well. After a 1.5 h incubation (37 °C, 5% CO₂), 0.5 mL of 70% perchloric acid was added into the cell medium. Gaseous ¹⁴CO₂ released from the cell medium over 1 h (room temperature) was trapped in the Whatman paper and used for liquid scintillation counting using a Tri-Carb 2800T liquid scintillation analyzer with QuantaSmart software. Parallel plates undergoing the same treatments were used to measure protein concentration and normalize counts per minutes (CPM/µg protein).

2.4.10 Glucose uptake assay

Cellular uptake of radiolabeled [³H]-deoxy-D-glucose in response to insulin was measured as described previously (Mao *et al.*, 2006b; Yun *et al.*, 2009), with minor modifications. Cells treated with fatty acids were stimulated 1 h with 100 nM insulin. Then, cells were washed twice with pre-warmed (37 °C) Krebs-Ringer buffer (118 mM NaCl, 4.8 mM KCl, 1.2 mM KH₂PO₄, 1.2 mM MgSO₄, 2.5 mM NaHCO₃, 11 mM D-glucose, 0.07% fatty acid-free BSA, pH7.4) prior to 20 min incubation in Krebs-Ringer buffer supplemented with (³H)-deoxy-D-glucose (0.5 μ Ci/mL). Plates were then placed on ice and the cells were washed three times with ice-cold DPBS. Cells were finally homogenized in lysis buffer (1% NP-40, 0.1% SDS) and the homogenate was used for both Bradford protein dosage and liquid scintillation counting using a Tri-Carb 2800T

liquid scintillation analyzer with QuantaSmart software. Disintegrations per minutes (DPM) were then normalized to protein concentration (DPM/µg protein).

2.4.11 Statistical analysis

Data are presented as mean \pm standard error of the mean (SEM). A Student's *t*-test was used to evaluate statistical significance. Generally, a one-tailed unpaired test was applied, except with data normalized to control where a "one sample" *t*-test is appropriate. A *p*-value < 0.05 was considered statistically significant. Each result has been obtained from at least three distinct cell cultures prepared on different days ($n \ge$ 3 independent replicates).

2.5 Results

2.5.1 Medium Chain Fatty Acids are not Cytotoxic but Induce Differential Effects on Mitochondria

To determine the effects of MCFA on hepatocyte viability, we exposed HepG2 cells to increasing doses (0.1–0.5 mM) of either palmitate or various MCFA before an MTT reduction assay. For reference, circulating fatty acids range between 0.2 mM and 2 mM in physiological conditions (Feldstein *et al.*, 2004; King *et al.*, 2008; Zhao *et al.*, 2016). While palmitate decreased cell viability in a dose-dependent manner, equivalent doses of various MCFA did not alter it (Figure 2.1a). Since the reduction of the MTT reagent is dependent on mitochondrial electronic flux (Senthilraja & Kathiresan, 2015), Figure 2.1a also indicates that, contrary to palmitate, MCFA treatments maintained this mitochondrial function.

Since mitochondrial membrane permeability and respiratory chain can both be damaged in cells exposed to free fatty acids (Garcia-Ruiz *et al.*, 2015; Neuschwander-Tetri, 2010; Schrauwen *et al.*, 2010), we compared the impact of a 24 h exposure to 0.25 mM MCFA or palmitate on mitochondrial membrane integrity using JC-1 fluorescence. As expected, palmitate strongly decreased average mitochondrial membrane potential. Incubation of cells with either C6 or C10 did not significantly damage mitochondrial membrane potential. However, C8 alone or in combination with C10 unexpectedly decreased it to an extent nearing the effect of palmitate (Figure 2.1b).

2.5.2 Medium Chain Fatty Acids do not Trigger Intracellular Lipid Storage or de Novo Lipogenesis

We next compared the effects of MCFA and LCFA on intracellular lipid storage. Unsurprisingly, palmitate potently increased the number (3-fold) and size (2-fold) of LD (Figure 2.2a–c). Moreover, palmitate substantially expanded the range of LD size (Figure S2.1a). In contrast, treating cells with MCFA did not induce modifications of LD characteristics (Figures 2.2 and S2.1).
Palmitate is known to increase lipid storage by triggering lipid synthesis in hepatocytes (Chen *et al.*, 2018; Yao *et al.*, 2011), a process mainly controlled by the SREBP-1 transcription factor (Strable & Ntambi, 2010). Not surprisingly, our analyses revealed that incubation with palmitate induced SREBP-1 maturation (Figure 2.3a). Accordingly, the expression of lipogenic genes (and SREBP-1 targets) *SREBF1c* and *FASN* was strongly induced by palmitate treatment (Figure 2.3b). Despite the transcriptional overexpression of *SREBF1c* (Figure 2.3b), abundance of the SREBP-1 precursor encoded by this gene was lowered (Figure 2.3a), suggesting massive proteolytic activation under palmitate treatment. In contrast, none of the MCFA tested had a significant effect on SREBP-1 maturation (Figure 2.3a). Interestingly, the expression of *SCD1*, though not substantially modulated by palmitate, was drastically downregulated by MCFA treatments (Figure 2.3b). Though it was not statistically significant, treatments including C10 tended to increase transcriptional expression of *PPARG* (Figure S2.1b), a gene mainly involved in fatty acid uptake and storage (Janani & Ranjitha Kumari, 2015).

2.5.3 Medium Chain Fatty Acids Sustain Lipid Catabolism

To complete our analysis of the lipid metabolism profile, we compared the effects of MCFA and LCFA on lipid catabolism. To do so, we measured the oleate oxidation rate. We also determined the expression levels of *CPT1A*, *PPARA*, and *PLIN5*, genes involved in the mitochondrial β -oxidation process (Adeva-Andany *et al.*, 2018; Rakhshandehroo *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2011). While palmitate tended to cause a decrease in fatty acid oxidation, MCFA did not (Figure 2.4a). We rather observed a trend towards higher oleate oxidation with C6 and C8 (Figure 2.4a). Consistent with these distinct results, *CPT1A* expression followed a similar pattern: Palmitate tended to increase it, with weaker effect from C10 (Figure 2.4b). Of note, all MCFA resulted in increased *CPT1A* expression relative to palmitate. *PPARA* expression was unexpectedly

increased by palmitate but remained unchanged following MCFA treatment (Figure 2.4b). Interestingly, expression of *PLIN5*, which encodes for a protein involved in LD-mitochondria linkage for fat utilization (Dalen *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2011), followed the same pattern as *PPARA* (Figure 2.4b).

2.5.4 Medium Chain Fatty Acids Maintain Insulin Sensitivity and Foster AKTmTOR Axis Activation

Lipid deposition in hepatocytes typically leads to insulin resistance (Ishii *et al.*, 2015; Tang *et al.*, 2015). As MCFA treatment did not lead to lipid deposition, we reasoned that it might not trigger insulin resistance either. To explore this possibility, we measured the cellular glucose uptake rate in response to insulin stimulation (100 nM, 1 h). As expected (Kerimi *et al.*, 2015; Tang *et al.*, 2015), palmitate drastically impaired insulin-induced glucose uptake, below the non-stimulated level (Figure 2.5). However, MCFA preserved normal cellular response to insulin (Figure 2.5).

We also measured the expression and phosphorylation level of two key proteins involved in the insulin signaling pathway in fatty acid-treated hepatocytes. The phosphorylation of AKT (Ser473) and mTOR (Ser2448) was evaluated in the basal state and after insulin stimulation (100 nM, 10 min). Palmitate diminished total AKT and total mTOR expression levels (Figure 2.6a). This observation is consistent with the fact that palmitate is known to trigger proteasomal degradation of insulin signaling proteins (Ishii *et al.*, 2015). Moreover, both AKT and mTOR became non-responsive to insulin stimulation after palmitate treatment (Figure 2.6), as expected from the literature (Ishii *et al.*, 2015; Yang *et al.*, 2013a). On the other hand, MCFA treatments preserved the expression levels of both kinases and the normal induction of AKT phosphorylation in response to insulin. MCFA also significantly increased the insulindependent phosphorylation of mTOR (by more than a 1.5-fold relative to insulinstimulated BSA control). At the same time, MCFA enhanced the basal phosphorylation of both kinases.

2.6 Discussion

In this study, we compared the effects of three distinct MCFA with palmitate, a wellcharacterized LCFA known for its lipotoxic effects (Gao et al., 2010; Li et al., 2018; Tang et al., 2015). Our study was exclusively conducted on HepG2 cells, a cell line derived from a hepatocellular carcinoma. Therefore, care should be taken in the extrapolation of our results to hepatocytes in vivo. As expected, palmitate damaged mitochondrial function and induced dose-dependent cell mortality (Figure 2.1), promoted lipid accumulation (Figures 2.2 and 2.3), impaired lipid catabolism (Figure 4), and triggered insulin resistance (Figures 2.5 and 2.6). In a manner consistent with previous reports (Akpa et al., 2010; Ronis et al., 2013; Wang et al., 2016a), exposure to 0.25 mM MCFA did not induce cell mortality (Figure 2.1a) or deleterious fat accumulation (Figure 2.2). Interestingly, MCFA innocuity seemed to be mediated, at least in part, by strong inhibition of SCD1 expression (Figure 2.3b); not only by nonactivation of SREBP-1 and subsequent lipogenesis. SCD1-synthesized monounsaturated fatty acids, mainly oleate and palmitoleate, are major substrates for TG synthesis (Lounis et al., 2015b; Xiao et al., 2016). Inhibition of SCD1 expression might, therefore, underlie the absence of TG accumulation in MCFA-treated cells. A similar decrease in SCD1 expression was reported following treatment of 3T3-L1 adipocytes with C8 (Guo et al., 2003). The effect of MCFA on SCD1 expression should be validated in a physiological context, in liver and adipose tissues.

2.6.1 Differential effects of MCFA on mitochondria

Exposure to palmitate is known to trigger oxidative stress that in turn impedes mitochondrial integrity and functions (Gao *et al.*, 2010; Hu *et al.*, 2018; Yang *et al.*, 2014). Accordingly, palmitate dramatically decreased the mitochondrial membrane potential of HepG2 cells (Figure 2.1b). Though MCFA are readily metabolized, they do not induce cytotoxic ROS accumulation or damages related to oxidative stress (Wang *et al.*, 2016b). Correspondingly, C6 and C10 preserved mitochondrial

membrane integrity. However, C8 administered alone or in combination with C10 unexpectedly impaired it (Figure 2.1b). C8 induced a mitochondrial membrane potential decrease that seemed insufficient to diminish mitochondrial activity, as MTT reduction (in the context of our cell viability assays) was not affected (Figure 2.1a). Indeed, a drop in mitochondrial membrane potential does not necessarily lead to the loss of mitochondrial functions (Chen *et al.*, 2004). As MCT have been found to promote mitochondrial biogenesis (Chamma *et al.*, 2017; Hughes *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2015), one possibility is that an increased number of mitochondria compensate for a less optimal membrane potential. Of note, exposure to C8 has been reported to cause some apoptosis in L02 hepatocytes, though at a much lower extent than LCFA (Li *et al.*, 2016a). It seems C8 can potentially have deleterious impacts on mitochondrial activity and/or hepatocyte viability under certain conditions.

2.6.2 Lipid Catabolism in MCFA-Treated Hepatocytes

MCFA-treated hepatocytes exhibited normal lipid anabolism, as shown by the measure of lipid synthesis markers and LD parameters (Figures 2.2 and 2.3). Palmitate-treated hepatocytes, however, displayed enhanced lipogenic gene expression and attenuated lipid catabolism (Figures 2.3 and 2.4), an imbalance that was associated with lipid accumulation (Figure 2.2). Consistent with their propensity towards rapid oxidation (Bach & Babayan, 1982; Papamandjaris *et al.*, 1998; Schönfeld & Wojtczak, 2016) and their antilipogenic effects (Akpa *et al.*, 2010), MCFA did not stimulate the cellular lipogenic process. Contrary to palmitate, MCFA did not impair the oxidation of exogenous oleate (Figure 2.4a). We speculate that CPT1A, the rate-limiting enzyme for mitochondrial β -oxidation (Calderon-Dominguez *et al.*, 2016), could be more efficient in MCFA-treated cells relative to palmitate, as malonyl-CoA (a de novo lipogenesis intermediate) is a potent inhibitor of the CPT system (Lloyd *et al.*, 1986; Solinas *et al.*, 2015). Moreover, C6- and C8-treated hepatocytes displayed higher expression of *CPT1A* (Figure 2.4b) than palmitate-treated cells. Increased *CPT1A* expression could result from mitochondria multiplication following MCFA exposure (Chamma *et al.*, 2017; Hughes *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2015). Interestingly, the effects of C10 and of the C8 + C10 mixture on oleate oxidation appeared weaker than for the other MCFA, and this was reflected in a weaker induction of *CPT1A* expression (Figure 2.4). In a neuronal cell model, C10 β -oxidation was recently proposed to be dependent on *CPT1A* (Khabbush *et al.*, 2017). This challenges the common assertion that all MCFA are readily oxidized, independently of the CPT system. Putative competition between oleate and C10 for mitochondrial translocation by CPT1A might underscore the tendency towards weaker oleate oxidation observed in C10-treated cells. Overall, MCFA appear to sustain a lipid metabolism balance favoring catabolism in hepatocytes, especially compared to palmitate.

MCFA treatment did not stimulate *PPARA* gene expression while palmitate did so quite efficiently (Figure 2.4b). This observation was unexpected since PPARA is typically associated with increased lipid catabolism (Pawlak et al., 2015). Dietary MCT enhance hepatic PPARA overexpression (Zhou et al., 2017a) and nuclear PPARa activity (Ronis et al., 2013) in rodents, in correlation with increased lipid oxidation (Ronis et al., 2013). In fact, CPT1A (Rakhshandehroo et al., 2010) as well as PLIN5 and PPARA itself (Chakravarthy et al., 2005; Dalen et al., 2007; Pineda Torra et al., 2002), are known transcriptional targets of PPARa (the protein encoded by PPARA) (Rakhshandehroo et al., 2010). Accordingly, PLIN5 followed the same pattern of expression as PPARA (Figure 2.4b). Our contrasting in vitro data may indicate that the influence of MCFA on PPARA-dependent catabolic responses does not only involve hepatocytes and that a more complex mechanism is at play in physiologic systems. Our data suggest that MCFA induce CPT1A expression independently of PPARa in hepatocytes (Figure 2.4). A similar *PPARA*-independent induction of *CPT1A* expression by C8 and C10 has also been reported in L02 hepatocytes (Wang et al., 2016a). PPARA overexpression in palmitate-treated cells could result from de novo lipogenesis since our data suggest that palmitate increased this pathway (Figure 2.3). In fact, some intracellular lipogenesis

intermediates activate PPARα (Pawlak *et al.*, 2015). In our study, MCFA did not activate lipogenesis nor did they stimulate *PPARA* expression.

2.6.3 AKT-mTOR Phosphorylation in MCFA-Treated Hepatocytes

The AKT-mTOR axis is central to the insulin signaling cascade (Titchenell et al., 2016). In our experiments, basal phosphorylation of AKT and mTOR was enhanced by all MCFA treatments (Figure 2.6). Basal AKT phosphorylation has been reported to be elevated in the livers of obese insulin-resistant mice (Liu et al., 2009). However, elevated basal phosphorylation of AKT has also been correlated to improved insulin sensitivity in hepatocytes (Ishii et al., 2015; Xu et al., 2016b). Basal AKT phosphorylation is therefore not necessarily indicative of insulin signaling activity. In our study, we observed lower insulin-induced AKT phosphorylation (Figure 2.6) and glucose uptake (Figure 2.5) after palmitate treatment. Importantly, we confirmed that AKT phosphorylation, as well as the insulin response, were preserved in MCFA-treated hepatocytes (Figures 2.5 and 2.6). This result is consistent with several in vivo studies where MCT-based HFD improved fasting glycemia, insulinemia, glucose tolerance, and insulin sensitivity (Geng et al., 2016; Wein et al., 2009; Zhou et al., 2017b). Though insulin-stimulated phosphorylation of mTOR was increased following MCFA treatment, insulin-stimulated phosphorylation of AKT (at Ser473) was not significantly so (Figure 2.6), perhaps because our robust stimulation protocol (100 nM, 10 min) saturated the phosphorylation of AKT. A hypothetical model we propose is that MCFA are readily oxidized in cells and stimulate the mTOR energy-sensing pathway (Zoncu et al., 2011), as reflected by the enhanced basal phosphorylation of mTOR (Figure 2.6b). The mTOR complex 2, directly activated by the mTOR complex 1, could then exert its positive feedback and enhance the basal phosphorylation of AKT (Rozengurt et al., 2014; Yang et al., 2015; Zoncu et al., 2011). While this proposed mechanism could explain an MCFA-triggered increase in basal AKT and mTOR phosphorylation, it does not explain the selective enhance in insulin-stimulated phosphorylation of mTOR. Further studies should be conducted in vivo to better characterize the effects of MCFA on hepatic insulin pathway under physiological conditions.

2.7 Conclusion

This study was designed to compare the effects of MCFA with palmitate, a representative LCFA, on lipid metabolism and insulin sensitivity in a hepatocellular model. We found that C6, C8, and C10 induced no deleterious lipid accumulation and no insulin resistance. In comparison, palmitate strongly impaired both lipid homeostasis and insulin sensitivity. As dietary lipids, MCFA could constitute a healthier alternative to LCFA, potentially preventing hepatic steatosis development. Care should be taken with C8 considering its potential impact on mitochondrial function. Of great interest, MCFA could effectively represent an interesting tool to manage insulin resistance, as they appear to potentiate the AKT-mTOR pathway in hepatocytes.

2.8 Ackmowledgments

The authors thank Denis Flipo (UQAM) for help with confocal microscopy and FACS analysis. The authors also acknowledge Marine Normand (IUT Laval, France) for her technical help in completing LD staining/counting experiments, as well as JC-1, glucose uptake and fatty acid oxidation assays. SAR was supported by a "Fond de Recherche du Québec-Nature et Technologie (FRQNT)" fellowship.

2.9 Conflicts of interest

S.A.R. and C.M. applied for a provisional patent regarding the in vivo application of MCFA towards the management of insulin resistance.

2.10 Supplementary materials

The following are available online. Figure S1: Lipid droplet size distribution and PPARG expression in MCFA-treated HepG2 cells.

2.11 Funding

This research received no external funding.

2.12 Figure legends

Figure 2.1 : Effect of fatty acids on HepG2 cell viability and mitochondrial membrane potential. HepG2 cells were treated for 24 h with palmitate (PALM), C6, C8, C10, a C8 + C10 equimolar mix, or vehicle control (BSA). (**a**) Quantitative analysis of MTT cell viability assay results (n = 3) relative to untreated cells (0.0 mM). # *p*-value < 0.05 versus palmitate treatment. (**b**) Mitochondrial membrane potential relative to vehicle-treated control, as measured with the JC-1 dye (n = 3). ** *p*-value < 0.01 versus BSA control.

Figure 2.2 : Effect of fatty acids on HepG2 intracellular lipid storage. HepG2 cells were treated 24 h with 0.25 mM PALM, C6, C8, C10, a C8 + C10 equimolar mix, or vehicle control (BSA). (a) Representative images of LD staining (green). Cell nuclei are shown in red. Scale bar = 20µm. (b) LD number per cell nuclei (n = 4). (c) Average LD size in µm² (n = 4). * *p*-value < 0.05, **** *p*-value < 0.001 versus BSA control.

Figure 2.3 : Effect of fatty acids on HepG2 lipid anabolism. HepG2 cells were treated 24 h with 0.25 mM PALM, C6, C8, C10, a C8 + C10 equimolar mix, or vehicle control (BSA). (a) Representative Western blots of precursor and mature (cleaved) SREBP-1 isoforms, as well as Cyclophilin-B loading control, and quantification of SREBP-1 maturation (mature/total ratio) relative to vehicle-treated control (n = 3). (b) *SREBF1c*, *FASN* and *SCD1* lipogenic marker mRNA expression relative to vehicle-treated control (n = 3). * p-value < 0.05 versus BSA control.

Figure 2.4 : Effect of fatty acids on HepG2 lipid β -oxidation activity. HepG2 cells were treated 24 h with 0.25 mM PALM, C6, C8, C10, a C8 + C10 equimolar mix, or vehicle control (BSA). (a) (¹⁴C)-oleate oxidation assay results relative to vehicle-treated control (*n* = 4). (b) *CPT1A*, *PPARA*, and *PLIN5* lipid catabolism marker mRNA

expression relative to vehicle-treated control (n = 3). * *p*-value < 0.05 versus BSA control, # *p*-value < 0.05 versus palmitate treatment.

Figure 2.5 : Effect of fatty acids on insulin-induced glucose uptake by HepG2 cells. HepG2 cells were treated 24 h with 0.25 mM palmitate (PALM), C6, C8, C10, a C8 + C10 equimolar mix, or vehicle control (BSA). (³H)-deoxy-D-glucose uptake assay results (n = 3) were obtained after a 1 h-long stimulation with 100 nM insulin (+). * p-value < 0.05, ** p-value < 0.01, *** p-value < 0.001 versus non-stimulated BSA control. # p-value < 0.05 versus stimulated BSA control.

Figure 2.6 : Effect of fatty acids on the insulin-induced signaling cascade in HepG2 cells. HepG2 cells were treated 24 h with 0.25 mM PALM, C6, C8, C10, a C8 + C10 equimolar mix, or vehicle control (BSA) then stimulated (+), or not (–), with 100 nM insulin for 10 min. (a) Representative Western blots of total and phosphorylated Akt (Ser473), total and phosphorylated mTOR (Ser2448), and Cyclophilin-B loading control (n = 4). (b) Quantification of phosphorylation levels normalized to total levels. * *p*-value < 0.05, ** *p*-value < 0.01 versus non-insulin stimulated. # *p*-value < 0.05 versus insulin-stimulated BSA control. & p-value < 0.05 versus non-insulin stimulated BSA control.

Supplementary figure 2.1 : Lipid droplet size distribution and PPARG expression in MCFA-treated HepG2 cells. (a) Once treated with fatty acids, HepG2 cells were processed for lipid droplet (LD) staining, imaging and analysis as described in section 2.4.6 of the article. Data are presented as mean \pm standard deviation. A one-tailed unpaired Student's t-test was used to evaluate statistical significance. A p-value < 0.05 was considered statistically significant (n = 4 independent replicates). ****, p-value < 0.0001. (b) Gene expression of PPARG have been evaluated following the procedure described in section 2.4.8 of the article, using primers PPARG_Fwd (TCTCTCCGTAATGGAAGACG) and PPARG_rev

(GCATTATGAGACATCCCCAC). Data are presented as mean \pm standard error of the mean (SEM). A "one sample" t-test was used to evaluate statistical significance. A p-value < 0.05 was considered statistically significant (n = 3 independent replicates).











Figure 2.4 :



Figure 2.5 :







Supplementary figure 2.1



2.13 Tables

Antibody Target	Manufacturer	Catalog Number	Concentration Used
SREBP-1	Santa Cruz Biotechnology	#sc-8984	1:2000
p-AKT (Ser473)	Cell Signaling Technology	#4060	1:1000
p-mTOR (Ser2448)	Cell Signaling Technology	#2971	1:1000
AKT (pan) mTOR Cyclophilin-B	Technology Cell Signaling Technology	#4691 #2972 #ab16045	1:1500 1:1000 1:50,000

 Table 2.1 : Primary antibodies used for Western blots

Table 2.2 :	Oligonucleotides	used for q	juantitative	RT-PCR	analysis

Gene Target	Forward Primer (5'-3')	Reverse Primer (5'-3')
SREBF1 c	ACAGTGACTTCCCTGGCCTAT	GCATGGACGGGTACATCTTC AA
CPTIA	ATCAATCGGACTCTGGAAAC GG	TCAGGGAGTAGCGCATGGT
PLIN5	AAGGCCCTGAAGTGGGTTT	GCATGTGGTCTATCAGCTCC A
PPARA	CGGTGACTTATCCTGTGGTCC	CCGCAGATTCTACATTCGAT GTT
FASN	AAGGACCTGTCTAGGTTTGA TGC	TGGCTTCATAGGTGACTTCC
SCD1	TTCCTACCTGCAAGTTCTACA CC	A CCGAGCTTTGTAAGAGCGGT
HPRT1	CCTGGCGTCGTGATTAGTGAT	AGACGTTCAGTCCTGTCCAT AA

CHAPITRE III

LES TRIGLYCÉRIDES À CHAÎNES MOYENNES INDUISENT LA THERMOGENÈSE HÉPATIQUE TOUT EN FAVORISANT LA BONNE SANTÉ MÉTABOLIQUE

A HIGH-FAT DIET ENRICHED IN MEDIUM CHAIN TRIGLYCERIDES TRIGGERS HEPATIC THERMOGENESIS AND IMPROVES METABOLIC HEALTH IN LEAN AND OBESE MICE

Sabri Ahmed Rial, Antoine Jutras-Carignan, Karl-Frédérik Bergeron and Catherine Mounier

Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids (BBA-Lipids). Mars 2020 ; 1865 (3).

Avant propos

Dans la suite logique du chapitre II dont les résultats nous ont convaincu quant à l'innocuité totale des MCFA sur le métabolisme lipidique des hépatocytes, en comparaison avec les LCFA, et de leur effet potentiellement bioactif bénéfique pour la sensibilité à l'insuline, nous avons choisi d'étudier *in-vivo* l'impact d'une consommation soutenue de lipides à chaînes moyennes. Plus exactement, nous avons émis l'hypothèse selon laquelle le remplacement des LCT des diètes grasses obésogènes ordinaires, par des MCT, serait une stratégie nutritionnelle prometteuse pour ralentir la progression des maladies métaboliques d'accumulations lipidiques, à savoir l'obésité et la stéatose hépatique non alcoolique et les symptômes associés comme la résistance à l'insuline.

Pour ce faire, en bref, nous avons soumis de jeunes souris mâles à des diètes grasses renfermant des ratios variables de MCT par rapport aux LCT. Nous avons alors observé que le remplacement graduel des LCT par des MCT réduisait effectivement les potentiels obésogène et stéatogène des diètes grasses, et prévenait la résistance à l'insuline, le tout d'une manière dose-dépendante. Cela confirmait qu'à doses ingérées égales, les MCT provoquaient significativement moins d'accumulation délétère de lipides que les LCT. Mais le plus intéressant a été de constater que chez les souris nourries avec la diète grasse hautement enrichie en MCT (renfermant le ratio MCT:LCT le plus haut), la prise de masse corporelle, l'expansion du tissu adipeux blanc, et la teneur en triglycérides hépatiques étaient significativement plus faibles que chez les contrôles non obèses, et que les marqueurs de la thermogenèse (Ucp1, Vdac1 et p-Ampk) étaient fortement induits dans le foie. En parallèle, grâce à une expérience effectuée in-vitro sur des cellules HepG2, nous avons révélé que la stimulation du gène UCP1 induite par les MCFA dans les hépatocytes, était dépendante de l'activité du récepteur GPR40/FFAR1. Ces découvertes nous ont permis de supposer que le potentiel préventif des MCT contre l'obésité et la stéatose hépatique n'était pas simplement dû à leur forte propension à être oxydés, comme cela était connu

jusqu'alors, mais résulterait aussi de leurs propriétés bioactives signalétiques se traduisant par l'activation de la voie catabolique de la thermogenèse par le foie. En outre, la constatation de l'induction des marqueurs thermogènes comme UCP1 dans le foie était, en soi, une nouveauté à la fois surprenante et intéressante.

C'est pour cela que nous avons choisi d'explorer la capacité des diètes enrichies en MCT à réduire le phénotype obèse et ses symptômes associés. Pour ce faire, nous avons soumis plusieurs groupes de souris obèses, insulinorésistantes et stéatosées, à l'une des diètes susmentionnées, pour évaluer l'impact de ces dernières sur leur santé métabolique. Il a été très intéressant de constater que la diète grasse hautement enrichie en MCT a provoqué des réductions significatives de la masse corporelle, de la résistance à l'insuline et de la stéatose hépatique chez les souris obèses, en concomitance avec l'induction des marqueurs de la thermogenèse aussi bien dans le foie que dans le tissu adipeux blanc sous-cutané. Ce deuxième volet de l'étude a confirmé que les effets bioactifs thermogènes des MCT présentent bien des effets curatifs contre les maladies d'accumulation des lipides.

Au final, les résultats du chapitre II renforcent considérablement l'hypothèse selon laquelle les lipides à chaînes moyennes alimentaires possèdent des propriétés préventives et curatives contre l'obésité et la stéatose hépatique non alcoolique.

Comme pour le chapitre précédent, j'ai été directement impliqué dans tous les aspects de ce travail de recherche, depuis sa conception et son exécution, jusqu'à sa soumission sous la forme d'un article scientifique. À chacune de ces étapes, j'ai été supervisé et guidé par les docteurs Catherine Mounier et Karl-Frédérik Bergeron.

3.1 Résumé

L'obésité, la stéatose hépatique et le diabète de type 2 sont des maladies métaboliques majeures favorisées par la consommation des triglycérides à chaînes longues (LCT). La caractérisation d'aliments bioactifs capables de moduler les maladies métaboliques est un axe de recherche en plein essor. Dans ce contexte, les triglycérides à chaînes moyennes (MCT) ont déjà été décrits comme des inducteurs du catabolisme ainsi que de la thermogenèse au niveau du tissu adipeux brun. La présente étude se propose donc d'évaluer l'impact, sur la santé métabolique, du remplacement des LCT d'une diète grasse obésogène, par des LCT. Pour ce faire, deux cohortes de souris C57BL/6, l'une composée de souris minces (cohorte A) et l'autre de souris obèses insulinorésistantes (cohorte B), ont été soumises durant 10 semaines à trois diètes grasses isocaloriques renfermant des proportions de MCT variables. L'analyse de la cohorte A a démontré que le remplacement des LCT par des MCT préserve la santé métabolique tout en induisant la thermogenèse hépatique. En parallèle, nous avons démontré que l'action activatrice des acides gras à chaînes moyennes sur l'expression du gène UCP1 est dépendante du récepteur FFAR1/GPR40, au niveau des hépatocytes. Dans la cohorte B, il a été observé qu'une diète riche en MCT promeut la diminution de la masse corporelle et une amélioration de la santé métabolique, tout en induisant les marqueurs de la thermogenèse dans le foie et dans le tissu adipeux sous-cutané. En conclusion, notre étude confirme que les MCT peuvent prévenir et guérir les maladies métaboliques.

MOTS CLÉS : Obésité ; stéatose hépatique non alcoolique ; résistance à l'inuline ; triglycérides à chaînes moyennes ; gène *UCP1* ; récepteur FFAR1/GPR40.

FAITS SAILLANTS

-Les MCT à forte dose activent la thermogenèse hépatique.
-FFAR1/GPR40 est requis pour l'induction de *Ucp1* par les MCT.
-Les MCT réduisent drastiquement les réserves de graisses hépatiques et adipeuses.
-Les MCT à forte dose réduisent la masse corporelle et préservent la résistance à l'insuline chez les animaux sains comme chez les animaux obèses.

3.2 Abstract

Obesity, liver steatosis and type 2 diabetes are major diseases partly imputed to energydense diets rich in long chain triglycerides (LCT). The search for bioactive nutrients that help to overcome metabolic diseases is a growing field. In this regard, medium chain triglycerides (MCT) were shown to promote lipid catabolism and to stimulate brown adipose tissue thermogenesis. The objective of our study was to evaluate if the replacement of LCT by MCT in high-fat diets could prevent and/or reduce metabolic disorders. For this purpose, two cohorts of C57BL/6 mice were fed during 10 weeks with three isocaloric high-fat diets with variable MCT content. Cohort A was composed of lean mice while cohort B was composed of obese, insulin resistant mice. In cohort A, replacement of LCT by MCT preserved metabolic health, in part by triggering hepatic thermogenesis. We further found that medium chain fatty acids promote thermogenesis markers within cultured hepatocytes in a FFAR1/GPR40-dependent manner. In cohort B, high-fat diets enriched in MCT promoted body fat depletion and caused metabolic health improvement, together with the induction of thermogenesis markers in the liver as well as in subcutaneous white adipose tissue. Our study supports that replacement of LCT by MCT in high-fat diets improve the metabolic features associated with obesity.

KEYWORDS: Obesity; liver steatosis; insulin resistance; medium chain triglycerides; UCP1; FFAR1/GPR40.

HIGHLIGHTS

- Medium chain triglycerides (MCT) drastically deplete hepatic lipid droplets and white adipose tissues.
- MCT improve body weight and insulin sensitivity in healthy and in obese mice.
- MCT induce thermogenic features in liver.
- FFAR1/GPR40 is required for induction of Ucp1 by MCT in hepatocytes.

3.3 Introduction

Lipid anabolism includes dietary lipid assimilation, via intestinal then peripheral fatty acid uptake, and endogenous lipid biosynthesis via *de novo* lipogenesis (DNL) (Bender, 2014; Strable & Ntambi, 2010). DNL converts excess of acetyl-CoA (produced by oxidation of high amounts of carbohydrates and lipids) into fatty acids. These latter mostly undergo esterification into triglycerides for long-term energy storage within lipid droplets (LD) and for systemic lipoprotein trafficking (Bender, 2014; Strable & Ntambi, 2010). On the other hand, the lipid catabolism coordinates lipolysis, which consists in triglyceride hydrolyzation into free fatty acids, with peroxisomal and mitochondrial β -oxidation of fatty acids to yield chemical energy (ATP) and heat (Adeva-Andany *et al.*, 2019; Calderon-Dominguez *et al.*, 2016).

Within metabolically active cells, lipid homeostasis is tightly regulated (Frayn *et al.*, 2006) for example by the widely conserved AMP-activated protein kinase (AMPK) (Carlson & Kim, 1973; Hardie, 2014). When activated by an increase in AMP relative to ATP (corresponding to a low energy state), AMPK directly triggers lipid catabolism (Carlson & Kim, 1973; Hardie, 2014; Jäger *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2011). Conversely, a decrease in the AMP:ATP ratio lowers AMPK activity, favoring lipid anabolism (Carlson & Kim, 1973; Hardie, 2014).

Obesity, an alarmingly prevalent condition (Smith & Smith, 2016b), results from metabolic imbalance caused by abnormally sustained lipid anabolism. Typically reflected by white adipose tissue (WAT) expansion (Virtue & Vidal-Puig, 2010) as well as by ectopic deposition of fats (Ebbert & Jensen, 2013; Virtue & Vidal-Puig, 2010), obesity is a strong contributor to metabolic diseases such as type 2 diabetes (Chadt *et al.*, 2000; Smith & Smith, 2016b) and liver steatosis (Al-Dayyat *et al.*, 2018a; Byrne, 2013; Dietrich & Hellerbrand, 2014). Long chain fatty acids (LCFA), that constitute the vast majority of common dietary fats (Dostálová *et al.*, 2005; Vingering *et al.*, 2010), are well documented to trigger such deleterious anabolic imbalance

(Fischer *et al.*, 2018; Gao *et al.*, 2010; Gao *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2018; Rial *et al.*, 2018b; Tang *et al.*, 2015; Xiao *et al.*, 2017; Zhao *et al.*, 2017).

One emerging strategy to overcome obesity and associated disorders consists in the stimulation of non-shivering thermogenesis (Cui & Chen, 2016b; Marinovic *et al.*, 2018; Nirengi *et al.*, 2016; Ohno *et al.*, 2012; Velickovic *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2017a) of metabolically active tissues such as brown and beige adipose tissues (BAT) (Betz & Enerback, 2015) as well as skeletal muscle (Fuller-Jackson & Henry, 2018). Activation of thermogenesis involves the biosynthesis of mitochondria overexpressing the uncoupling protein 1 (UCP1) that actively dissipates a part of chemical energy into heat (Brondani *et al.*, 2012; Cui & Chen, 2016b).

Several bioactive compounds have been characterized as potent inducers of thermogenesis in BAT and WAT (Marinovic et al., 2018; Nirengi et al., 2016; Ohno et al., 2012; Velickovic et al., 2019; Zhang et al., 2017a). Recently, dietary medium chain triglycerides (MCT) have been shown to activate thermogenic features at the level of the interscapular BAT (Kim et al., 2017; Zhang et al., 2015). MCT are esterified saturated fatty acids with chain lengths not exceeding ten carbon atoms, called medium chain fatty acids (MCFA) (Babayan, 1987; Bach & Babayan, 1982; Eyres et al., 2016). Concentrated MCT oils consist usually of esterified octanoic (C8) and decanoic (C10) acids (Eyres et al., 2016). MCFA undergo a metabolism that is distinct from LCFA (Rial et al., 2016b). In brief, dietary MCFA are transported to the liver via the hepatic portal blood system independently of chylomicron trafficking, and their translocation across mitochondrial membranes is not rate-limited by the carnitine palmitoyltransferase (CPT) system (Papamandjaris et al., 1998; Schönfeld & Wojtczak, 2016). These properties allow MCFA to be mainly metabolized by the liver, where they preferentially undergo a not rate-limiting mitochondrial β-oxidation instead of reesterification (Papamandjaris et al., 1998; Schönfeld & Wojtczak, 2016). We previously demonstrated that, contrary to LCFA, MCFA do not induce triglyceride accumulation within hepatocytes, and better promote lipid catabolism. MCFA also improve insulin sensitivity by increasing basal and insulin-induced phosphorylation of the AKT-mTOR insulin signaling pathway (Rial *et al.*, 2018b). MCFA have otherwise been reported to activate PPARγ (Liberato *et al.*, 2012a) and FFAR1/GPR40 (Li *et al.*, 2016b) pathways.

In the present study, we showed that dietary fat in the form of MCT lead to global metabolic health improvement in lean as well as in obese mice. Dietary MCT noticeably triggered thermogenic features in the liver, and also tended to induce them in subcutaneous WAT. This provides new insight on the metabolically beneficial bioactive properties of MCT.

3.4 Materials and methods

3.4.1 Mice and diets

Three-week old male C57BL/6 mice (Charles River laboratories, Canada) were acclimated to our animal facilities during two weeks prior to diet protocols. Mice were continuously housed, 4 per cage at 24±1°C in a 12h light/dark cycle, with free access to water. UQAM's animal care committee approved all experimental procedures (CIPA protocol 780).

Four diets, whose caloric breakdown and nutritional composition are detailed in Table 1, were used (Research Diets, USA): i- a standard low-fat diet (LFD; cat. #D12450H) with 10% kcal from fat (5% from lard LCT and 5% from soy oil LCT); ii- a standard high-fat diet (HFD; cat. #D12451) with 45% kcal from fat (40% from lard LCT and 5% from soy oil LCT); iii- a customized high-fat diet (M20) with 45% kcal from fat (20% from MCT, 20% from lard LCT and 5% from soy oil LCT); and iv- a second customized high-fat diet (M40) with 45% kcal from fat (40% from MCT and 5% from soy oil LCT). The diet manufacturer used plant-based Dermol M-5 (ALZO international Inc.) MCT oil, containing 60% C8 and 40% C10, were used to produce our modified diets.

A first cohort of 32 mice (designated as cohort A) was divided in 4 groups of 8 mice and continuously fed ad-libitum with either LFD, HFD, M20 or M40 diets for 10 weeks. A second cohort of 32 mice (cohort B) was first fed with HFD for 10 weeks to induce obesity and insulin resistance, then divided in 4 groups of 8 mice and fed LFD, HFD, M20 or M40 diets for 10 more weeks.

Mice were euthanized after a 6h diurnal fast and plasma samples were stored at -20°C for future analyses. Whole livers, and WAT samples (dorsal subcutaneous, epididymal) were flash-frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C.

3.4.2 Body weight, food and energy intake

Individual body weight was monitored weekly and weight change was calculated as a percentage of the reference weight measured at week 0 in cohort A and at week 10 in cohort B. Food consumption in each cage was monitored daily, during 10 weeks on the experimental diets, as the difference (in grams) between the food supplied and the quantity of food remaining divided by the number of animals per cage. Individual energy intake was calculated as the product of food intake and energy content of diets (see **Table 1**). Areas under curve (AUC) of energy intake (in kcal) as function of time (in weeks) were computed using the trapezoidal function of the GraphPad software. At the end of the 10-week diet period, the food efficiency ratio was calculated by dividing weight gain per total food intake.

3.4.3 Glucose homeostasis

Glycemia measurement, glucose tolerance tests (GTT) and insulin tolerance tests (ITT) were assessed after a 6h diurnal fast. Blood glucose concentration was measured on 2µl of tail vein blood using an Accu-Chek Aviva glucometer (Roche). For GTT, glycemia was evaluated at time-points -15, 0, 15, 30, 60, 90 and 120 min where 0 was the time of intraperitoneal D-(+)-Glucose injection (1 g/kg body weight; Sigma-Aldrich, cat. #G8270). For ITT, glycemia was evaluated at time-points -15, 0, 15, 30, 45, 60 and 90 min where 0 was the time of intraperitoneal injection of human recombinant insulin (0.5 U/kg body weight; ThermoFisher Scientific, cat. #12585-014). Data are presented as AUC of blood glucose concentration as function of time (in minutes). In cohort A, GTT and ITT were performed at weeks 8 and 9 respectively. Homeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA-IR) was calculated from plasma samples as follow: [glycemia (mM) x insulinemia (ng/ml)] / 22.5. In cohort B, GTT were performed at week 0, 8 and 18, while ITT were performed at weeks 9 and 19. Note that the week 0 and 8 GTT confirmed HFD-induced glucose intolerance before the diet switch.

3.4.4 Circulating markers

Circulating markers were measured from plasma samples. Fasting insulinemia and leptinemia were quantified using ELISA kits (Crystal Chem, cat. #90080 and cat. #90030), and triglyceridemia was quantified using a colorimetric assay kit (Cayman Chemical, cat. #10010303-96), according to the manufacturer's protocols.

3.4.5 Histology

Liver and WAT (subcutaneous and epididymal) samples were fixed in Bouin's solution (75% saturated picric acid, 7.5% formaldehyde, 5% glacial acetic acid) overnight at room temperature prior to paraffin embedding. Liver microtome sections (8 μ m) were stained with Masson's trichrome while adipose tissue microtome sections (8 μ m) were stained with hematoxylin and eosin. Samples were visualized under white light using a Nikon Eclipse Ti microscope equipped with a Scion CFW-1612C color-camera. LD size and area within liver sections, as well as adipocyte size, were measured using the Particle Analysis function of the ImageJ software, after the conversion of images into binary format. For LD measurements, the Particle Analysis function has been set to consider LD with a sphericity coefficient of 0.7-1.0 and a size range of 0.07-2000 μ m², thus excluding vessels and artefacts.

3.4.6 Western blots

Total proteins were extracted from liver samples with a RIPA buffer (50 mM Hepes, 125 mM NaCl, 100 mM NaF, 10 mM Na-pyrophosphate, 10% glycerol, 1% Triton X-100, 1.5 mM MgCl2, 1 mM ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid, 2 mM Na-orthovanadate, 1.5 mM PMSF, 1× cOmplete protease inhibitors, pH 7.2). Protein concentration was determined by the Bradford method (Bradford, 1976), then diluted at 1 μ g/ μ L in Laemmli buffer (50 mM Tris-HCl at pH 6.8, 5% β -mercaptoethanol, 2% sodium dodecyl sulfate (SDS), 0.01% bromophenol

blue, 10% glycerol) before denaturation (5 min at 95°C). Denatured proteins (20 µg) were loaded onto SDS-PAGE, and immunoblot analyses were carried out using the primary antibodies (Table 3.11.2). Horseradish peroxidase (HRP)-conjugated anti-rabbit IgG (Abcam, cat. #ab6721) or anti-mouse IgG (Cell Signaling technology, cat. #7076) were used as secondary antibodies (1:4000). Bands were visualized with a chemiluminescent HRP substrate (Millipore Sigma, cat. #WBKLS0500). Bands intensities were measured by the Analyze Gels function of the Image J software.

3.4.7 Cell culture and treatments

HepG2 human hepatocellular carcinoma cells (ATCC, cat. #HB-8065) were cultured in Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM) supplemented with fetal bovine serum (10%), penicillin (100 U/mL) and streptomycin (100 μ g/mL) under standard conditions (37°C, 5% CO₂). Cells were then starved 24 h in fetal bovine serum-free EMEM and treated 6 h with 0.25 mM of an equimolar mixture of sodium hexanoate (C8) and sodium decanoate (C10). When required, cells were exposed to either 10 μ M T0070907 (PPAR γ inhibitor), 10 μ M DC260126 (FFAR1/GPR40 antagonist) or DMSO vehicle one hour prior to and during C8/C10 treatment, for a 7 h total exposure time.

3.4.8 RNA extraction and quantitative PCR

Total RNA was extracted from liver, subcutaneous and epididymal adipose tissues, and HepG2 cells, using TRIzol Reagent (Life Technologies, cat. #15596-018; Carlsbad, USA) following the manufacturer's instructions. One to five μ g of total RNA was reverse transcribed into cDNA using SuperScript II reverse transcriptase (Life Technologies, 18064-022, Carlsbad, USA). Quantitative PCR was performed on 50 ng cDNA using gene specific primers pairs (**Table 3**) and the Luna Master Mix reagent (New England Biolabs, cat. # M3003L, USA) in a Light Cycler 480 thermocycler (Roche, cat.# 05015278001). Gene expression was calculated using the comparative Δ Ct method (Livak & Schmittgen, 2001).

3.4.9 Statistical analysis

Data are presented as mean \pm standard error of the mean. The GraphPad 8 software was used to perform Student's t-tests. A one-tailed unpaired test was applied, except with data normalized to one control where a "one sample" t-test is appropriate. A *p*-value less than 0.05 was taken as indicative of a statistically significant difference between groups.

3.5 Results

3.5.1 A high-fat diet enriched in MCT does not adversely affect body weight or insulin sensitivity

Mice of cohort A were three-week old male C57BL/6 fed either the LFD or the three different isocaloric fat-rich diets for 10 weeks (Fig.3.1A-B). A standard high-fat diet (HFD) containing 45% kcal from LCT was used as an obesogenic control diet. The M20 HFD contained 20% kcal from MCT while the M40 HFD contained 40% kcal from MCT.

As expected, HFD feeding resulted in a 33% weight gain relative to LFD feeding (Fig.3.1C, Supp.Fig.S3.1). Interestingly, stepwise replacement of LCT by MCT (M20 and M40 diets) decreased the impact of HFD on weight gain in a dose-dependent manner. Even more mice on the M40 diet exhibited a 10% smaller weight gain than the LFD controls (Fig.3.1C, Supp.Fig.S3.1). Energy intake was equivalent among experimental groups (Fig.3.1D) showing that the effects of the M20 and M40 diets were due to their low food efficiency ratio relative to the standard HFD (Fig.3.1E) avoiding the loss of insulin sensitivity (Fig.3.1F) and glucose clearance efficiency (Fig.3.1G, Supp.Fig.S3.1). M40-fed mice even exhibited an insulin sensitivity similar to LFD lean controls (Fig.3.1F-H, Supp.Fig.S3.1). Overall, MCT replacement diminished (M20) or completely prevented (M40) HFD-induced insulin resistance.

3.5.2 A high-fat diet enriched in MCT improves markers of hepatic health

Since liver steatosis is a well-established comorbidity effect of obesity and insulin resistance (48), we evaluated the impact of our experimental diets on hepatic tissue. Standard HFD induced a strong fat accumulation in livers. This was characterized by lipid macrovesicles reaching 63 μ m² (*versus* 15 μ m² in LFD) and covering 22% of the tissue area (*versus* 2.5% in LFD; Fig.3.2A-C). The M20 diet was also steatogenic, but LD were 25% smaller and less abundant in M20-fed livers than after standard HFD feeding (Fig.3.2A-C). Interestingly, the M40 diet had a radical effect, causing a near-

abolishment of hepatic LD (Fig.3.2A). Indeed, M40 substantially decreased (3-fold) the average hepatic LD size and tended to decrease (2-fold) the total area covered by LD, relative to LFD control (Fig.3.2B,C). None of the four experimental diets induced collagen fiber infiltration as evidenced by the complete lack of blue stains within livers parenchyma following Masson's trichrome histological preparation (Fig.3.2A). This indicates that hepatic fibrosis was not induced. Consistently with LD content, liver weight was increased by 60% and 50% in HFD-fed and M20-fed mice respectively, compared to LFD (Fig.3.2D). Interestingly, liver weight was decreased in M40-fed mice, being even 20% lower than in LFD-fed mice. The liver index (liver to body weight ratio) remained unchanged among the 4 groups (*data not shown*).

Hepatic steatosis is often associated with insulin resistance and, as a corollary, absence of hepatic steatosis is favorable to insulin sensitivity preservation (49, 50). We therefore measured the phosphorylation state of Akt kinase (on serine 473), a reliable marker of tissue-specific insulin sensitivity (51). This phosphorylation tended to be inhibited in HFD-fed mice compared to LFD-fed mice, while livers of mice fed with the M20 and M40 diets displayed a strong increase in Akt phosphorylation relative to HFD (Fig.3.2E). This suggests that the MCT-containing diets potentiate liver's insulin sensitivity, contrary to steatogenic HFD.

3.5.3 A high-fat diet enriched in MCT triggers the overexpression of thermogenesis markers in the liver

Given that the M40 HFD diet did not induce an increase in hepatic weight or LD content, we reasoned that a MCT-rich diet might activate specific lipid catabolic processes in the liver. Expression of the lipolysis marker *Atgl* was not overly modulated by the fatty diets (Fig.3.3A) while, relatively to HFD, MCT diets dose-dependently increased the expression of the beta-oxidation and mitochondrial biogenesis markers *Cpt1a* and *Ppargc1a*, respectively (Fig.3.3B,C). Strikingly, the M40 diet triggered a 6.7-fold increase in *Ucp1* gene expression, a key thermogenesis marker, at a level close to statistical significance (p=0.066, Fig.3.3D). To further characterize thermogenesis

in liver samples, we measured the abundance of Vdac1 and Ucp1 proteins, as well as the phosphorylation of Ampk (on threonine 172) which reflects the intracellular AMP:ATP balance. The three markers were increased by more than 2-fold, in livers of M40-fed mice (Fig.3.3E-G). The M20 diet did not trigger these thermogenic features. To delineate the molecular mechanism underlying the induction of *Ucp1* expression by MCT consumption, we evaluated the expression of canonical endogenous activators of thermogenesis. Neither Adrb3 gene expression (Zhang et al., 2015), PPARy activity (Ohno et al., 2012) – as reported by the expression of its hepatic target gene Cd36 – nor Fgf21 gene expression (Fisher et al., 2012) was increased in livers from M40-fed mice (Supp.Fig.S3.2). We next evaluated the direct effect of MCFA on hepatocytes, as they are abundant (in their non esterified form) in the hepato-portal system after the digestion of dietary MCT (Babayan, 1987; Bach & Babayan, 1982; Guillot et al., 1993). This may indeed trigger hepatic Ucp1 expression trough activation of the above mentioned FFAR1/GPR40. Treatment of HepG2 human hepatoma cells with an equimolar mixture of C8 and C10 (mimicking MCT oil) effectively increased UCP1 gene overexpression by 3.5-fold (Fig.3.3H). Moreover, this induction was significantly impeded in the presence of a FFAR1/GPR40 inhibitor, confirming the involvement of this receptor (Fig.3.3H). We also confirmed that a PPARy antagonist has no inhibitory effect on MCFA-induced UCP1 overexpression (Fig.3.3H).

3.5.4 A high-fat diet enriched in MCT does not trigger WAT expansion

Mice on M40 displayed a lower level of circulating triglycerides than HFD-fed mice, at a level similar to that of LFD-fed mice (Fig.3.4A). Mice fed with high-fat diets enriched in MCT showed, in a dose-dependent manner, lower circulating leptin levels than mice raised on the standard HFD. Moreover, leptin level was 6 times lower in M40-fed mice than in LFD-fed mice (Fig.3.4B).

These results indicated that the MCT diets potentially lowered white adiposity in comparison with the HFD, because both circulating leptin and triglyceride levels are
key markers positively correlated with white adiposity expansion (Ludgero-Correia et al., 2012; Skurk et al., 2007). Interestingly, the epididymal fat deposit was almost absent in M40-fed mice (Fig.3.4C). The subcutaneous WAT was also less abundant in M40-fed than in any other mice from the cohort (*data not shown*). While the HFD almost doubled adipocyte size, M20 and M40 MCT-enriched diets dose-dependently prevented adipocyte hypertrophy in both epididymal WAT (Fig.3.4D,E) and subcutaneous WAT (Fig.3.5A-B). Moreover, the average size of subcutaneous adipocytes tended to be lower in M40-fed mice than in the LFD control (Fig.3.5A,B). To better understand the underlying molecular mechanisms at play in these adipose tissues, we measured the expression levels of various genes involved in lipid metabolism. In epididymal tissue, the experimental diets did not modulate the expression of the *Srebf1* gene (Fig.3.4F) which encodes for the master upregulator of lipogenesis Sterol regulatory element-binding transcription factor 1 (Srebp1) (Wang et al., 2015b). Feeding mice with the M40 diet increased Cd36 expression 2-fold (Fig.3.4G), while Cpt1a expression was increased 3-fold by the three energy dense diets (Fig.3.4H). Ppargc1a expression was inhibited under the HFD and M20 diet, and was maintained to a similar level than for the LFD under the M40 diet (Fig.3.4I). Expression of Ucp1 was not modulated either (Fig.3.4J). In subcutaneous adipose tissue, dietary MCT replacement dose-dependently decreased Srebfl expression and increased Cd36 expression (4.5-fold under M20 and 3-fold under M40), relative to the HFD (Fig.3.5C,D). Our experimental diets had little or no effect on Cpt1a and Ppargc1a expression (Fig.5E,F). Ucp1 expression was decreased to residual levels by the HFD and M20 diets but was preserved by the M40 diet (Fig.3.5G). Overall, compared to the standard HFD, dietary MCT had a more benefic impact on lipid metabolism in subcutaneous than in epididymal adipocytes.

3.5.5 Body weight and insulin resistance are reduced in metabolically unhealthy obese mice raised on a high-fat diet enriched in MCT

Since M40 ameliorates the metabolic features of healthy mice, we hypothesized that a MCT-enriched diet could ameliorate the metabolic disorders observed in unhealthy obese animals. Therefore, we fed C57BL/6 male mice during 10 weeks with the standard HFD in order to induce marked weight gain, high fasting glycemia and glucose intolerance (Supp.Fig.S3.3). We then transferred these mice to LFD, M20 or M40 diets for 10 additional weeks (cohort B; Fig.3.6A). We also maintained one group on the HFD as control. Following the week of diet switch, weight gain continued to increase in the HFD and M20 groups (Fig.3.6B,C). Conversely, following the diet switch, the LFD as well as the M40 triggered a rapid weight loss sustained during six weeks, before a slight increase to the initial values (Fig.3.6B). Despite this late rescue, LFD and M40 globally triggered 2% and 5% weight loss, respectively, in obese mice (Fig.3.6C).

Global energy intake, after the diet switch, was equal among HFD-, M20- and M40fed mice, and 13% higher than under LFD (Fig.3.6D), maybe resulting from appetizing effect of fats. While HFD and M20 impaired glucose homeostasis, M40 and LFD rescue glucose homeostasis (Fig.3.6E,F, Supp.Fig.S3.4,S3.5). However, the M20 diet failed to reverse weight gain (Fig.3.6B,C) or alterations in glucose homeostasis (Fig.3.6E,F; Supp.Fig.S3.4,S3.5).

3.5.6 A high-fat diet enriched in MCT improves steatosis and stimulates the expression of thermogenesis markers in the liver of obese animals

We next characterized the livers of cohort B mice. Switching from HFD to the M40 diet significantly decreased hepatic steatosis, in comparison with replacement by M20 or LFD (Fig.3.7A). Compared to LFD, the M40 diet led to a 2-fold decrease of hepatic LD size, and a near statistically significant (p=0.54) 2-fold decrease of hepatic LD tissue area coverage (Fig.3.7B,C). We noticed a heterogenous distribution of LD in liver samples from MCT-fed mice. LD-rich areas were interspersed with regions

depleted in LD, and these depleted regions were systematically located around a vessel (Fig.3.7A; *4x zoom*). At the same time, both liver weight and liver index were further increased by HFD and M20 diet, and 15% lower under the M40 diet, compared to LFD-fed mice (Fig.3.7D,E). Consistently with these results, hepatic basal phosphorylation of Akt (S473) was inhibited 2-fold by the HFD and the M20 diet, and preserved by the M40 diet, relative to the LFD (Fig.3.7F).

To evaluate the importance of lipid catabolism in the antisteatogenic effect of dietary MCT, we then measured the hepatic expression of genes related to this process. None of the diets modulated hepatic *Atgl* expression (Fig.3.7G). Relative to LFD, both M20 and M40 diets tended to induce hepatic *Cpt1a* expression (Fig.3.7H). However, only the M40 diet increased *Ppargc1a* and *Ucp1* hepatic expression, by 1.6-fold and 2.5-fold respectively (Fig.3.7I,J).

3.5.7 Expression of thermogenesis markers are increased in subcutaneous WAT of obese mice on a MCT enriched diet

Considering that MCT enriched high-fat diets had a stronger impact on subcutaneous adipocytes than on epididymal adipocytes in cohort A, we evaluated the impact of our diet switch on the expression of metabolic markers in the subcutaneous WAT of obese animals from cohort B. Surprisingly, transition from the HFD to the M40 diet increased both Srebf1 and Cd36 expression relative to the M20 diet and HFD control (Fig.3.8A,B). Moreover, the M20 diet tends to decrease the expression of Cpt1a while the M40 tends to increase it (Fig.3.8C). Interestingly, both the M20 and M40 diets tended, but not significatively, to increase Ppargc1a and Ucp1 thermogenesis marker expression, in a dose-dependent manner (Fig.3.8D,E).

3.6 Discussion

In this study we characterized the impact of dietary MCT on mouse metabolic health. We showed that replacement of LCT by MCT dose-dependently reduces the obesogenic and steatogenic effect of a HFD. Dietary MCT trigger marked elevation of thermogenesis features at the hepatic level. These thermogenic features are concomitant with a reduction of liver steatosis, body weight loss, and metabolic improvement in unhealthy obese mice. The most notable results were obtained in the liver, not in adipose tissue, supporting the central role of hepatic thermogenesis in the metabolically beneficial effects of dietary MCT. The main limitation of our study is that only male mice were used. As sexual dimorphism has previously been observed in relation to MCT feeding and lipid metabolism (Tucci *et al.*, 2015), the impact of MCT enriched diets on obesity-related metabolism features in females should be investigated in further studies.

Common sources of saturated and monounsaturated LCT, such as lard, are consensually thought to promote unhealthy lipid accumulation (Kim *et al.*, 2014; Sun *et al.*, 2017a). Herein, replacement of lard by MCT in fat-rich diets dose-dependently prevents obesity induction. This result is consistent with the propensity of medium chain lipids towards rapid oxidation (Rial *et al.*, 2016b). Previous studies also reported that MCT-based lipid-rich diets (comparable to the M40 diet) prevent weight gain and obesity features in rodents (De Vogel-van den Bosch *et al.*, 2011; Geng *et al.*, 2016; Rial *et al.*, 2016b; Zhou *et al.*, 2017b). Going further, our study shows that M40 feeding resulted in a body weight gain substantially lower than under LFD feeding. A plausible mechanism explaining this observation is the strong effect of the M40 diet on thermogenic and lipid catabolism features, especially in the liver, a result never documented following removal of lard from diets (Luijten *et al.*, 2019). By triggering thermogenic catabolic processes in the liver, in a manner not induced by LFD, this MCT-rich diet likely promotes the mobilization for oxidation of hepatic, circulating and adipose fat stores, leading to a significant reduction in body mass. This clearly

suggests that the effects observed are induced by the addition of MCT and not by the removal of lard. We also showed here that dietary MCT stimulated the hepatic lipid catabolic process, as evidenced by increased *Cpt1a* and *Ppargc1a* gene expression (Fig.3.3B,C). In agreement with our observations, MCT and their unesterified MCFA derivatives have been reported to promote lipid catabolism in isolated hepatocytes (Rial *et al.*, 2018b; Wang *et al.*, 2016a), in muscles (Montgomery *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2018a), in WAT and BAT (Kim *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2015), as well as mitochondrial biogenesis and activity in piglet livers (Zhang *et al.*, 2016).

We also showed a marked induction of *Ucp1* expression in liver samples of mice fed with the M40 diet. This was surprising since *Ucp1* has been reported to be mainly expressed in BAT and at a lower extent in WAT, but not in liver (Shore *et al.*, 2013). However, we showed that hepatic *Ucp1* gene expression in M40-fed mice was accompanied by elevated expression of the mitochondrial abundance marker Vdac1(Fig.3.3E) (Mazure, 2016; Yeo *et al.*, 2019) and the Ucp1 protein (Fig.3.3F). The expression of phosphorylated Ampk (T172) (Fig.3G) was also increase indicating a low ATP:ADP+AMP ratio (Hardie, 2014). This suggests that hepatic Ucp1 induction, after MCT-enriched feeding, was relevant in terms of functional thermogenesis, a catabolic pathway which promotes fat depletion. Moreover, phosphorylated Ampk directly participates in the activation of lipid catabolism (Carlson & Kim, 1973; Hardie, 2014), which could in turn contribute to the lack of hepatic steatosis (Fig.3.2A-D), and insulin resistance (Fig.3.2E), following MCT intake. Thermogenesis is known to decrease reactive oxygen species production (Brondani *et al.*, 2012; Cadenas, 2018), and may in part contributed to M40-fed mice hepatic health.

Several investigators reported that dietary MCT boost thermogenesis in brown adipose tissues (Baba *et al.*, 1987; Kim *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2015) and upregulate thermogenesis markers (such as UCP1) in skeletal muscles (Wang *et al.*, 2018b). In terms of liver effects, Chamma *et al.* recently reported that a MCT enriched diet (similar to our M40 diet) also increased hepatic Pgc1 α and Ucp3 expression levels (Chamma *et al.*, 2017). However, this was associated with marked liver steatosis, in

contradiction with our results. This discrepancy probably reflects the fact that the MCT-rich diet used by Chamma *et al.* was 30% more caloric than their control diet (Chamma *et al.*, 2017), Moreover, this caloric surplus was not provided by fats or sugar, explaining lack of adiposity, but by casein whose long term consumption at high doses is known to trigger strong liver steatosis (Diaz-Rua *et al.*, 2017).

Reproducing the *in vivo* effect of dietary MCT, we showed that MCFA treatment, at physiologically relevant concentrations (Haidukewych *et al.*, 1982; Sills *et al.*, 1986) also significantly increased *UCP1* expression in cultured HepG2 cells (Fig.3.3H). This observation demonstrates that MCFA derived from dietary MCT, known to efficiently enter the hepatic portal vein circulation, have the potential to directly foster thermogenesis of hepatic parenchyma. Our data also suggests that this effect is probably mediated by the FFAR1/GPR40 receptor (Fig.3.3H). Interestingly, C8 and C10 are known FFAR1/GPR40 agonists (Huang *et al.*, 2014). In addition, treatment of mouse livers and HepG2 cells with the FFAR1/GPR40 agonist GW9508 prevented, in an AMPK-activation dependent manner, lipid accumulation induced by steatogenic challenges (Li *et al.*, 2016b). In addition, C10 was shown to amplify glucose-stimulated insulin secretion by pancreatic β -cells in a FFAR1/GPR40-dependent fashion (Pujol *et al.*, 2018). Of note, *UCP1* induction by MCFA was not completely abrogated by the FFAR1/GPR40 antagonist in our assays, suggesting that other pathways may be involved in mediating the MCFA effect on *UCP1* expression.

Our study suggests that high amounts of MCFA derived from hydrolyzed dietary MCT reach the liver, resulting in hepatic LD depletion likely via an FFAR1/GPR40dependent activation of thermogenesis. Previous reports have shown that medium chain lipids also decrease VLDL production by hepatocytes (Sato *et al.*, 2005; Tachibana *et al.*, 2002). These reports, coupled with our observations, lead us to hypothesize that MCT decrease the availability of circulating fatty acids, thus drastically reducing the fatty acid supply needed for triglyceride synthesis and storage by peripheral tissues such as WAT. Consistently with the metabolic profile observed on our MCT-fed mice, prevention of adipocyte hypertrophy is, furthermore, a well-recognized marker for optimal metabolic health (Ghaben & Scherer, 2019). However, MCT-rich diets did not increase thermogenesis markers in WAT, highlighting the importance of hepatic thermogenesis in the metabolic effects of MCT in lean mice.

Even if the liver readily oxidizes most of dietary MCFA, it seems that a small proportion of MCFA, mainly as C10 (You *et al.*, 2008), evades liver catabolism to induce peripheral effects (Han *et al.*, 2003). In fact, it has been suggested that, in rats, dietary MCFA exert a direct lowering effect on epididymal and perirenal white adiposity by decreasing *PPARy* and *CEBPa* gene expression, as well as LPL activity (Han *et al.*, 2003). Other studies, conducted on 3T3-L1 preadipocytes, have revealed that C8 and C10 activate PPAR γ , promoting adipocyte differentiation (Liberato *et al.*, 2012a; Yang *et al.*, 2009). In our study, MCT presumably increased PPAR γ activity in WAT, as revealed by the induction of its *Cd36* target gene (Wheeler & Gekakis, 2014). Yet, adipose expansion could not occur for the reason proposed above.

In metabolically unhealthy obese mice, we showed that the M40 diet decreased body weight, insulin resistance and liver steatosis. This result is in agreement with a previous study showing that both C8 and C10 decreased lipid stores within steatosed hepatocytes by promoting lipolysis and decreasing lipogenesis (Wang *et al.*, 2016a). In our obese mice however, hepatic *Atgl* was not increased by MCT feeding, but *Ppargc1a* and *Ucp1* were induced, suggesting that *in-vivo* resorption of hepatic steatosis by MCT diets involves thermogenesis rather than lipolysis. Interestingly in cohort B, liver samples of M20-fed mice were dotted with areas without steatosis around blood vessels (Fig.3.7A). One possibility is that dietary MCFA reach hepatic blood vessels from which they undergo simple diffusion to activate catabolic features in the surrounding parenchyma.

Otherwise, markers of thermogenesis tended to increase in subcutaneous adipose tissue of mice from cohort B on the M40 diet (Fig.3.8C-E). This suggests that, in obese mice, MCT have the potential to trigger the browning of WAT. In accordance with this concept, MCT feeding reduces obesity in part via the elevation of thermogenesis from

scapular BAT (Zhang *et al.*, 2015). This may be explained in part by the fact that in obese mice with steatosis hepatic lipid catabolism is low. Therefore, significant amounts of MCFA (higher than in lean mice) evade liver oxidation reaching the WAT. Once in the WAT, they could activate PPAR γ , triggering the PPAR-dependent browning phenotype (Ohno *et al.*, 2012).

In conclusion, we found that in healthy lean mice, consumption of high amounts of MCT prevent metabolic disorders likely by triggering thermogenesis within the liver, preventing body fat expansion. We suggest that the liver is a key metabolic organ where MCT exert their metabolically beneficial thermogenic effects in a FFAR1/GPR40-dependent manner. In obese metabolically unhealthy mice, MCT-rich diets also improved the metabolic profile, and enhanced the levels of thermogenesis markers in the liver as well as in the subcutaneous WAT. Overall, our study consolidates the concept that dietary MCT are bioactive lipids that could be helpful for the prevention and the treatment of metabolic disorders related to obesity, such as non-alcoholic fatty liver disease, dyslipidemia and insulin resistance.

3.7 Acknowledgments and financial support

The authors thank Denis Flipo (UQAM) for help with microscopy and image analysis. The authors also acknowledge laboratory interns Sarah-Clohé Lacoste, Nathalie Pesin and Maxime Borret for their technical contribution. The authors are grateful for the feedback provided by Mohamed Amine Lounis (CRCHUM). SAR received doctoral scholarships from FRQNT and *Fondation de l'UQAM*. This research was supported by a grant from NSERC (Discovery Grants Program). Authors are grateful to SERVIER Medical Art creators for allowing free access to their images bank, which was used to construct the graphical abstract.

3.8 Disclosures

The authors declare having no conflicts of interest related to this work

3.9 Figure legends

Figure 3.1 : High-fat diets enriched in MCT do not adversely affect body weight nor insulin sensitivity. (A) Experimental timeline for cohort A. Mice were raised for 10 weeks on diets LFD, HFD, M20 and M40. (B) Percentage of energy content (kcal) from long chain triglycerides (LCT) and medium chain triglycerides (MCT) in the four diets. The dashed line shows the standard 45% kcal content from fat. (C,D,E) Area under curve (AUC) of body weight gain, total energy intake, and food efficiency ratio during 10 weeks of diets, for each group (n = 8). (F) HOMA-IR determined for each diet group at week 10 (n = 4). (G,H) AUC of glycaemia variations measured during glucose tolerance tests (GTT) at week 8, and insulin tolerance tests (ITT) at week 9 (n = 4). Data are shown as mean \pm SEM. Asterisks (*) are used to indicate statistical comparisons with the LFD group while number signs (#) denote comparisons with the HFD control. Student's t-test: * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001.

Figure 3.2 : A high-fat diet rich in MCT improves markers of hepatic health. (A) Representative images of liver sections from cohort A animals, stained with Masson's trichrome. Blue arrows point to examples of very small and sporadic LD in M40 hepatic samples. Scale bar: 200 microns. (B,C) Quantification of lipid droplet size and proportion of tissue area occupied by lipid droplets in the liver sections (n = 3). The dashed red line indicates the steatosis threshold (more than 5% tissue area). (D) Liver weight (n = 8). (E) Phosphorylation level of AKT (on Ser473) in liver homogenates (n = 8). Representative Western blots are shown. Phospho-AKT expression was normalized to Cyclophilin-B. Data are shown as mean \pm SEM. * compare with the LFD group. # compare with the HFD control. Student's t-test: * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001.

Figure 3.3 : A high-fat diet rich in MCT triggers the overexpression of key markers of thermogenesis in liver. (A-D) Gene expression of *Atgl*, *Cpt1a*, *Ppargc1a*

(n = 4) and *Ucp1* (n = 7) normalized by *Hprt1*, in hepatic tissue from cohort A (n = 4). (E-G) Protein expression of Vdac1, Ucp1 and phospho-Ampk (on Thr172) in hepatic tissue (n = 8). Representative Western blots are shown. Vdac1 was normalized to α -Tubulin while Ucp1 and phospho-Ampk were normalized to Cyclophilin-B. (H) Expression of *UCP1* transcript in HepG2 cells, normalized to the *Hprt1* (n = 3). Cells were treated 6h with MCFA (125 μ M C8 + 125 μ M C10) and with either vehicle (CTL), the PPAR γ inhibitor T0070907 (PPAR γ I, 10 μ M) or the FFAR1/GPR40 antagonist inhibitor DC260126 (GPR40I, 10 μ M). *Ucp1* expression were normalized to vehicle-treated cells. Data are shown as mean ± SEM. * compare with the LFD group and # compare with the HFD group. & designate comparisons with the DMSO-treated cells., and † compare with the MCFA-treated condition. Student's t-test: * *p* < 0.05, ** *p* < 0.001, **** *p* < 0.0001.

Figure 3.4 : A high-fat diet rich in MCT exert beneficial effects on visceral white adipose tissue. (A,B) Circulating triglycerides (TG) and leptin from cohort A plasma samples (n = 4). (C) Representative photographs of dissected mouse abdomens with epididymal (Ep) WAT highlighted in yellow. (D) Representative images of epididymal white adipose tissue sections, stained with H&E. (E) Quantification of adipocyte size in the tissue sections (n = 3). (F-J) Expression of *Srebf1*, *Cd36*, *Cpt1a*, *Ppargc1a* and *Ucp1* transcripts, normalized to *Hprt1*, in epididymal white adipose tissue (n = 4). Data are shown as mean \pm SEM. * compare with the LFD group, and # compare with the HFD group. Student's t-test: * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001, **** p < 0.0001.

Figure 3.5 : A high-fat diet enriched in MCT exert beneficial effects on subcutaneous white adipose tissue. (A) Representative images of subcutaneous white adipose tissue (WAT) tissue sections, stained with H&E. (B) Quantification of adipocyte size in the tissue sections (n = 3). (C-G) Expression of *Srebf1*, *Cd36*, *Cpt1a*, *Ppargc1a* and *Ucp1* transcripts, normalized to *Hprt1* (n = 4). Data are shown as mean

 \pm SEM. * compare with the LFD group, and # compare with the HFD control. Student's t-test: * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001.

Figure 3.6 : Body weight and insulin resistance are reduced in metabolically unhealthy obese mice fed a high-fat diet enriched in MCT. (A) Experimental timeline for cohort B. Mice were raised for 10 weeks on HFD then switched to diets LFD, HFD, M20 and M40 for another 10 weeks. (B) Body weight change after diet switch in percentage *versus* body weight measured at week 10 (n=8). The dotted line represents a theorical unchanged body weight percentage. (C) Area under curve (AUC) of body weight change after diet switch, in comparison with AUC of the theorical unchanged (Stable, hatched histogram) body weight percentage (n = 8). (D) AUC of total energy intake measured for each group from the day of diet switch (n=2). (E,F) AUC of GTT and ITT results measured before (at week 8 and week 9 respectively) and after diet switch (n = 4). The dotted lines outline the values before diet switch. Data are shown as mean \pm SEM. * compare with the LFD group. Ψ is used for comparisons of body weight change percentage with theorical unchanged (B), and \$ for comparisons with the pre-switch diet values (C,D). Student's t-test: * p < 0.05, ** p < 0.01, **** p << 0.0001.

Figure 3.7 : A high-fat diet enriched in MCT improves steatosis modulating hepatic lipid catabolism in obese animals. (A) Representative images of liver sections from cohort B animals, stained with Masson's trichrome. Yellow arrowheads point to blood vessels. Zoom boxes show a 4-fold magnification of regions of the microscope field. (B,C) Quantification of LD size and proportion of tissue area occupied by LD in the liver sections (n = 3). (D,E) Liver weight and liver index (liver weight / body mass) in cohort B (n = 8). (F) Evaluation of phospho-AKT (Ser473) by Western blot normalized to Cyclophilin-B in liver homogenates (n = 8). Representative blots are shown. Gene expression of hepatic *Atgl, Cpt1a, Ppargc1a* and *Ucp1*, normalized to *Hprt1* (n = 4). Data are shown as mean \pm SEM. * compare with the LFD

group, and # compare with the HFD group. Student's t-test: * p < 0.05, ** p < 0.01, **** p < 0.0001.

Figure 3.8 : Expression of thermogenesis markers are increased in subcutaneous WAT of obese mice on a MCT enriched diet. (A-E) Gene expression of *Srebf1*, *Cd36*, *Cpt1a*, *Ppargc1a*, and *Ucp1* normalized to *Hprt1*, in subcutaneous WAT from cohort B (n = 4). Data are shown as mean \pm SEM. * compare with the LFD group, and # compare with the HFD group. Student's t-test: * p < 0.05, ** p < 0.01.

Supplementary Figure 3.1 : High-fat diets rich in MCT do not adversely affect body weight nor insulin sensitivity, in cohort A. (A) Body weight change in percentage of body weight measured at week 0 (n=8). (B) Glucose tolerance test (GTT) and (C) insulin tolerance test (ITT) respectively performed at weeks 8 and 9 (n=8). Data are shown as mean \pm SEM. * compare with the LFD group, and # compare with the HFD group corresponding to the same time on x-axis. Student's t-test: * p < 0.05, ** p < 0.01, **** p < 0.0001.

Supplementary Figure 3.2 : Hepatic markers of canonical thermogenesisactivating pathways are not induced by MCT-rich diets, in cohort A mice. (A-C) Expression of *Adrb3*, *Cd36*, and *Fgf21* transcripts, normalized to *Hprt1*, in liver samples from cohort A (n = 4). Data are shown as mean \pm SEM. * compare with the LFD group, and # compare with the HFD group. Student's t-test: * p < 0.05.

Supplementary Figure 3.3 : High fat diet (HFD)-induced obesity and glucose homeostasis impairment in mice of cohort B. (A) body weight (n=32), (B) fasting glycemia (n=4) and (C) AUC of GTT (n=4) measured at early and late timepoints of the 10-weeks long HFD-based protocol feeding for mice of cohort B. Data are shown as mean \pm SEM. * compare with week 0 (A,C) or week 3 (B), and # compare with week 8 (A,B). Paired student's t-test: ** p < 0.01, **** p < 0.0001.

Supplementary Figure 3.4 : Glucose intolerance is reduced in metabolically unhealthy obese mice fed a high-fat diet rich in MCT. GTT performed on mice from cohort B at weeks 0 and 8 of the obesity-induction step, then at week 8 after the diet switch. Data were obtained from mice that have been transferred to LFD (A), HFD (B), M20 (C) and M40 (D) diets (n=4). Results are mean \pm SEM. * compare each timepoint of the GTT measured at week 8 with the equivalent timepoint measured at week 0, and # similarly compare week 18 with week 8. Paired student's t-test: * p < 0.05, *** p < 0.001, **** p < 0.0001.

Supplementary Figure 3.5 : Insulin resistance is reduced in metabolically unhealthy obese mice fed a high-fat diet rich in MCT. ITT performed on mice from cohort B at week 9 of the obesity-induction step, then at week 9 after the diet switch. Data were obtained from mice that have been transferred to LFD (A), HFD (B), M20 (C) and M40 (D) diets (n=4). Results are mean \pm SEM. # compare each timepoint of the ITT measured at week 19 with the equivalent timepoint measured at week 9. Paired student's t-test: # p < 0.05, ## p < 0.01, ### p < 0.001.

3.10 Figures













0.5 0.0

ст́∟

MCFA

MCFA

MCFA +PPARyi +GPR40i





Epididymal WAT



Subcutaneous WAT





































3.11 Tables

Diets	LFD		HFD		MCT-20		MCT-40	
Composition (%)	g	kcal	g	kcal	g	kcal	g	kcal
Proteins	19,2	20	24	20	24	20	24	20
carbohydrates	67,3	70	41	35	41	35	41	35
fat	4,3	10	24	45	24	45	24	45
total		100		100		100		100
kcal/g	3,85		4,7		4,7		4,7	
Compounds	g	kcal	g	kcal	g	kcal	g	kcal
Casein, 80 Mesh	200	800	200	800	200	800	200	800
L-cystine	3	12	3	12	3	12	3	12
corn starch	452,2	1808	72,8	291	72,8	291	72,8	291
Maltodextrine	75	300	100	400	100	400	100	400
Sucrose	172,8	691	172,8	691	172,8	691	172,8	691
Cellulose	50	0	50	0	50	0	50	0
Soy oil	25	225	25	225	25	225	25	225
Lard	20	180	177,5	1598	87,4	787	0	0
МСТ	0	0	0	0	90,1	811	177,5	1598
minerals	45	0	45	0	45	0	45	0
Vitamins	12	40	12	40	12	40	12	40
TOTAL	1055	4057	858,2	4057	858,2	4057	858,2	4057

Species	Gene target	Forward Primer (5'-3')	Reverse Primer (5'-3')		
Mus musculus	Atgl	GGAACATCTCATTCGCTGGC	CCAGGTTGAAGGAGGGATGC		
	Cptla	GACTCCGCTCGCTCATTCC	ACCAGTGATGATGCCATTCTTG		
	Ppargcla	GTTCACTCTCAGTAAGGGGC	GTCGCTACACCACTTCAATCC		
	Ucp1	AACACTTTGGAAAGGGACGAC	CAAAACCCGGCAACAAGAGC		
	Srebfl	GGACACTGAGAGACCCCTGC	TCCATTGCTGGTACCGTGAG		
	Cd36	GATGACGTGGCAAAGAACAG	TCCTCGGGGTCCTGAGTTAT		
	Adrb3	CCTTCAACCCGGTCATCTACTG	CGCACCTTCATAGCCATCAAAC		
	Fgf21	ACCGCAGTCCAGAAAGTCTC	TGCAGGCCTCAGGATCAAAG		
	Hprt1	TCAGTCAACGGGGGGACATAAA	GGGGCTGTACTGCTTAACCAG		
Ното	UCP1	CAACAGCTATGTCCTCCCCG	ACGTTCCAGGATCCAAGTCG		
Sapiens	HPRT1	CCTGGCGTCGTGATTAGTGAT	AGACGTTCAGTCCTGTCCATAA		

Table 3.2. Primers sequences for mouse and human genes used in real-time PCR.

Table 3.3. Antibodies used for Western blots.

Antibody	Marrie	Catalog	Carrier	Concentration
target	Manufacturer	number	Source	Used
p-Akt (S473)	Cell Signaling	4060S	Rabbit	1:2.000
	Technology			
Vdac1	Abcam	ab14734	Mouse	1:1.000
Ucp1	Abcam	ab155117	Rabbit	1:2.000
p-Ampk (T172)	Cell Signaling	25358	Rabbit	1.2 000
	Technology		itaoon	1.2.000
Cyclophilin-B	Abcam	ab16045	Rabbit	1:50.000
α-Tubulin	Abcam	ab4074	Rabbit	1:50.000

CHAPITRE IV

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

4.1 Conclusion

Le but principal des travaux de cette thèse était de déterminer si les lipides à chaînes moyennes pouvaient être utilisés comme des aliments bioactifs à des fins de prévention, voire de réduction de l'accumulation délétère des lipides.

Bien qu'il soit au premier abord contre-intuitif d'attribuer de tels effets à des lipides, il convient de rappeler d'abord que la consommation des lipides à chaînes moyennes est absolument marginale dans la société, car les sources de gras les plus populaires (l'huile de palme, le beurre, l'huile de tournesol, l'huile d'olive, le lard, etc.) n'en renferment que très peu voire pas du tout (Deffense, 1997). Ceci marque une première différence avec les lipides à chaînes longues qui constituent la majorité des graisses alimentaires. L'autre particularité fondamentale des lipides à chaînes moyennes est leur forte propension à être catabolisés peu après la digestion. Autrement dit, les lipides à chaînes moyennes alimentaires sont davantage convertis en énergie chimique sous forme d'ATP, et non stockés sous forme de TG, ce qui favoriserait une balance plutôt catabolique. Ce fait étant relayé depuis plusieurs décennies, il a donc régulièrement été suggéré que le remplacement massif des lipides à chaînes longues par des lipides à chaînes moyennes représenterait une avenue intéressante dans la prévention de l'obésité, de la stéatose hépatique non alcoolique, et des maladies métaboliques associées. En effet, dans la diète occidentale moderne les graisses atteignent jusqu'à 42% de la teneur calorique, et près de la moitié de ces graisses sont des LCT saturés à chaînes longues (Deffense, 1997; Drewnowski & Almiron-Roig, 2010). L'idée du remplacement des lipides à chaînes longues par des lipides à chaînes moyennes pour prévenir les maladies métaboliques, bien que pertinente et maintes fois vérifiée pour son efficacité, accorde un rôle passif aux lipides à chaînes moyennes au niveau des maladies métaboliques. Cette idée repose généralement sur le fait que les lipides à chaînes moyennes n'induisent pas d'accumulation des lipides tout simplement parce qu'ils sont efficacement oxydés.

La présente thèse contribue à ajouter un élément nouveau à ce modèle, et c'est ce en quoi elle représente une avancée importante dans les domaines de la biologie fondamentale du métabolisme, de la nutraceutique et donc de la nutrition également. Elle démontre que les lipides à chaînes moyennes sont capables d'induire des processus cataboliques clefs *via* leurs fonctions bioactives, contribuant à une balance métabolique favorable.

Dans notre première étude présentée dans le chapitre II, nous avons comparé l'impact des MCFA C6, C8 et C10, administrés seuls ou en combinaison C8+C10, à celui du LCFA palmitate sur des hépatocytes de la lignée HepG2. Nous avons alors observé qu'à des doses croissantes correspondant à des concentrations lipidiques physiologiques normales ou à des concentrations équivalentes à celles retrouvées en cas d'obésité, les MCFA n'induisaient pas de mort cellulaire. Le fait que les MCFA n'induisaient pas ou relativement peu de chute du potentiel de membrane mitochondrial était un élément supplémentaire plaidant pour leur innocuité en opposition au palmitate hautement lipotoxique. Contrairement à ce dernier, les MCFA n'ont pas induit l'expression des gènes de la DNL ni entrainé l'accumulation excessive des gouttelettes lipidiques. Au contraire, leur présence dans le milieu des hépatocytes tendait même à préserver voire même à induire dans une certaine mesure, l'oxydation des lipides et l'expression du gène CPTIA. Dans le même temps, les MCFA n'ont pas induit de résistance à l'insuline comme le faisait le palmitate et ont même augmenté, par un mécanisme dont nous avons suggéré qu'il impliquait une forte propension à l'oxydation lipidique et un niveau d'activation plus élevé de la voie de réponse à l'insuline AKT/mTOR. Globalement, cette première étude a confirmé que les MCFA

n'induisaient pas d'accumulation lipotoxique de lipides et prévenaient la stéatose. De plus, cette étude a révélé pour la première fois que les MCFA potentialisaient la réponse des hépatocytes à l'insuline.

Dans une seconde étude présentée dans le chapitre III, nous avons cherché à confirmer le potentiel antistéatogène et antiobésogène des lipides à chaînes moyennes sur des souris. Cette étude a d'abord démontré que des diètes grasses chargées en MCT plutôt qu'en lard retardaient d'une manière dose dépendante la prise de poids corporel, la progression de la résistance à l'insuline, la stéatose hépatique, l'expansion du tissu adipeux blanc et l'hypertrophie des adipocytes blancs. Comme dans l'étude précédente, les niveaux hépatiques basaux de phosphorylation de la kinase AKT étaient augmentés. De plus, les indicateurs clefs du processus de la thermogenèse, habituellement mesurés dans les tissus adipeux brun et beige, étaient significativement surexprimés dans les foies de souris nourries avec la dose maximale de MCT, suggérant un effet activateur de ces derniers sur la thermogenèse hépatique. Dans des cellules HepG2, la présence d'un antagoniste au GPR40/FFAR1 a inhibé l'induction d'UCP1 par les MCFA, suggérant que ce récepteur médierait au moins en partie l'action thermogène des MCT sur le foie. Par ailleurs, aussi bien dans les hépatocytes HepG2 exposés aux MCFA (chapitre II, figure 2.1) que dans les foies de souris non obèses nourries avec la diète M40 (chapitre III, figure 3.2), la phosphorylation basale (hors stimulation à l'insuline) de la kinase AKT (Ser473) était accrue. Or, il a déjà été démontré que l'activation du GPR40/FFAR1 avec ses agonistes naturels ou synthétiques se traduit par la phosphorylation activatrice des protéines de la voie des MAPK ainsi que d'AKT (Matoba et al., 2018; Mena et al., 2016), tel que l'illustre la figure 4.3 présentée dans la section 4.2.2.1.1. Donc, ces résultats pris ensemble corroborent l'hypothèse selon laquelle les effets bioactifs des MCFA sur le tissu hépatique seraient médiés, au moins en partie, par le GPR40/FFAR1.

Puisqu'il était désormais prouvé que les MCT activaient le processus catabolique de la thermogenèse, nous avons supposé qu'ils pourraient efficacement réduire les réserves lipidiques et donc limiter les complications métaboliques de souris obèses malades. En

effet, la diète hautement enrichie en MCT a entrainé une réduction significative de la masse corporelle, de la stéatose hépatique et de la résistance à l'insuline de souris obèses, tout en poussant à la hausse l'expression des gènes thermogènes, dans le foie et dans le tissu adipeux blanc. Cela suggère que les MCT réduiraient l'obésité en partie *via* la stimulation de la thermogenèse par le foie et le brunissement du tissu adipeux blanc.

4.2 Perspectives

Les travaux de recherche présentés dans les chapitres II et III de cette thèse constituent une réelle avancée dans la compréhension des fonctions bioactives des lipides à chaînes moyennes, et participent à consolider le consensus grandissant qui attribue à cette classe particulière de lipides des propriétés prometteuses pour la prévention et la réduction des maladies métaboliques comme l'obésité, la stéatose hépatique non alcoolique et la résistance à l'insuline. Par le recours aux données récentes de la littérature et dans l'optique de mieux comprendre les mécanismes sous-jacents aux résultats obtenus, ce dernier chapitre se propose de formuler des perspectives de recherche.

4.2.1 La thermogenèse hépatique : une cible prometteuse

4.2.1.1 La pertinence de cibler la thermogenèse hépatique pour induire une balance métabolique optimale

Selon la littérature, la thermogenèse d'origine autre que l'activité physique et le grelottement est largement imputée aux tissus adipeux brun et beige, lorsqu'elle survient en réponse au froid et/ou à l'agonisme des PPARs (Heeren & Scheja, 2018). La thermogenèse hépatique est beaucoup moins étudiée que la thermogenèse adipeuse et musculaire. Elle serait plutôt impliquée dans la thermogenèse induite par la diète. Sa contribution à la dépense énergétique totale est généralement sous-estimée voire ignorée par la plupart des études. Pourtant, il a très tôt été démonté chez le rat que la température du foie était supérieure à celle du sang y afférant (Stoner, 1973). De plus, la température hépatique augmente à mesure que la température extérieure diminue entre 30° C et 20° C, et ce phénomène adaptatif est totalement inhibé après l'administration du β -bloquant (qui bloque les récepteurs β -adrénergiques) propranolol (Stoner, 1973). Cela démontre non seulement que la thermogenèse hépatique est un processus non négligeable mais aussi qu'elle est régulée de la même manière que celle des tissus adipeux bruns et beiges, avec notamment l'implication du système nerveux

sympathique. Il a même été estimé que la thermogenèse hépatique contribue à 70% au moins de la thermogenèse postprandiale totale induite par le système nerveux sympathique en réponse à une diète de type cafétéria (Ma *et al.*, 1987). Selon Ma *et al.*, une diète de type cafétéria est hautement sapide, riche en lipides, en glucides et en protéines, et censée stimuler l'ingestion d'énergie ainsi que la DIT (Rothwell & Stock, 1988; Sampey *et al.*, 2011). Plus récemment, enfin, il a été démontré que l'irisine, plus connue sous l'appellation de l'hormone de l'exercice physique (pour des raisons que nous évoquerons plus amplement dans la section 4.2.3.2) augmente la dépense énergétique globale des souris obèses en même temps qu'elle augmente l'expression de PPAR γ , de PGC1 α et d'UCP1 aussi bien dans les tissus adipeux et les muscles, que dans le foie (Niranjan *et al.*, 2019). La fonction thermogène du foie est donc un processus non négligeable. La thermogenèse hépatique pourrait même être plus intéressante à cibler que celle du tissu adipeux brun, étant donné la taille relativement résiduelle de ce dernier.

L'étude que nous avons présenté dans le chapitre III montre clairement que la consommation d'une diète grasse hautement enrichie en MCT (40% Kcal/45 issus de MCT), contrairement au LCT, augmente l'expression de marqueurs moléculaires clefs de la thermogenèse dans le foie des souris non obèses comme celui des souris obèses. Les résultats du même chapitre suggèrent que les MCFA, plus susceptibles de se retrouver dans la circulation porte hépatique après la digestion des MCT, activeraient directement l'expression hépatocytaire d'UCP1 par un mécanisme dépendant de GPR40/FFAR1. Cela suggère que les MCT alimentaires stimulent la thermogenèse hépatique postprandiale, contribuant ainsi à une balance énergétique favorable au ralentissement et à la réduction de la stéatose hépatique, de l'obésité, et des complications associées.
4.2.1.2 L'expression hépatique des gènes de la thermogenèse induite par les lipides à chaînes moyennes se traduit-elle véritablement par une activité thermique accrue ?

4.2.1.2.1 Mesure in vitro de l'activité thermogène des hépatocytes exposés aux MCFA

Récemment, Kriszt et al. (2017) ont caractérisé une nouvelle sonde moléculaire dérivée du BODIPY, le ERthermAC, comme un composé faiblement toxique, hautement assimilable par les cellules et à la haute photostabilité. Le ERthermAC est très efficace pour étudier les niveaux de thermogenèse de cellules isolées (Kriszt et al., 2017). Plus exactement, il s'agit d'une molécule photo-excitable qui se localise dans le réticulum endoplasmique et dont la fluorescence est inversement proportionnelle à la température. Or, dans les adipocytes bruns où cette sonde a été optimisée, la proximité entre les mitochondries (très abondantes) et le réticulum endoplasmique est suffisamment importante pour que le ERthermAC soit directement influencé par la température mitochondriale (Kriszt et al., 2017). Le ERthermAC est donc un indicateur fiable de la thermogenèse induite par le découplage mitochondrial des adipocytes bruns. Cela est d'autant plus avéré qu'en utilisant du carbonyl cyanide p-(tri-fluromethoxy)phenylhydrazone (FCCP), un agent artificiel causant un découplage maximal et rapide au niveau de la membrane interne mitochondrial, les auteurs ont noté une baisse corrélée de la fluorescence du ERthermAC (Kriszt et al., 2017). Il est vrai que le ERthermAC n'a jamais été utilisé sur des hépatocytes et que nous n'avons pas la garantie qu'il serait un indicateur fiable de la thermogénèse de ces cellules. Par contre, il est bien connu que lors d'un jeûne ou lorsque les taux de glucose sont bas, les mitochondries et le réticulum endoplasmique des hépatocytes interagissent directement par l'établissement de sites de contacts entre les mitochondries et le réticulum appelés mitochondriaassociated membranes (MAMs) (Rieusset, 2018). Donc nous pensons qu'une privation de glucose offrirait un contexte optimal au bon fonctionnement du ERthermAC dans les hépatocytes, validant notre outil expérimental.

Afin de vérifier si l'expression hépatocytaire des gènes thermogènes induite par les MCFA se traduit bel et bien par plus de flux thermique mitochondrial, nous proposerons que des cultures primaires d'hépatocytes de souris soient exposées à des doses croissantes d'un mélange équimolaire de C8 et de C10, et à des temps croissants. Ensuite, après remplacement du milieu et exposition des cellules à un milieu à faible concentration de glucose et sans lipides, l'activité thermogène des hépatocytes sera mesurée à l'aide de la sonde ERthermAC. L'expérience pourra être reproduite à l'identique avec, cette fois, la présence de l'antagoniste au GPR40/FFAR1 (le DC260126) pour confirmer l'implication de ce dernier dans la médiation de l'effet des MCFA.

En parallèle, il serait intéressant de reproduire l'expérience avec le C8 et le C10 administrés séparément aux cellules, ce que nous n'avons pas fait dans le chapitre III. Cela permettra de vérifier si les deux MCFA ont un effet permissif, additif, ou synergique sur la thermogenèse hépatocytaire, ou encore si seulement un seul des deux MCFA l'active (masquant l'inefficacité du second en traitement combiné). Cette dernière éventualité retient notre attention car, comme le montre la figure 2.1.B du chapitre II, le C8 (contrairement au C10) a entrainé une chute significative du potentiel de membrane mitochondrial sans induire de mort cellulaire (donc sans lipotoxicité mitochondriale comme ce fut le cas du palmitate), ce qui est typiquement associé au découplage mitochondrial (Krauss *et al.*, 2002; Rieusset, 2018). En effet, l'activité des UCP réduit le potentiel de membrane des mitochondries (Krauss *et al.*, 2002). Il se pourrait donc que le C8 soit un inducteur de la thermogenèse hépatocytaire bien plus efficace que le C10, ce qui permettrait de raffiner l'usage des MCFA. L'expérience proposée le dira.

4.2.1.2.2 Mesure in vivo des niveaux de thermogenèse hépatique d'animaux nourris avec des MCT

Dans notre étude présentée en chapitre III, l'élévation des marqueurs clefs de la thermogenèse induite par la diète M40 s'était aussi traduite par une hausse de la

phosphorylation de l'AMPK, ce qui est en soi une preuve indirecte de thermogenèse comme discuté dans le troisième paragraphe de la section 3.6 de cette thèse. Par contre, une évaluation directe de la contribution hépatique à la thermogenèse totale serait nécessaire pour consolider cette assertion.

Pour cela, nous pourrions utiliser comme modèle biologique des souris de la lignée C57BL/6, mâles femelles, rendues ou non obèses par une diète HFD (reprenant ainsi les paradigmes « préventif » et « curatif » du chapitre III). Nous ferons en sorte que, chez ces souris, l'expression hépatique d'UCP1 sera spécifiquement inhibée (ou non pour les contrôles), par exemple en recourant à une délétion conditionnelle par recombinaison Cre-lox spécifique au foie (Postic & Magnuson, 2000; Song & Palmiter, 2018). Plus exactement, les souris transgéniques de la souche albumin-Cre, développée par Postic et ses collaborateurs en 2000 et dont le promoteur du gène albumine (gène spécifiquement exprimé dans le foie) est ciblé pour l'expression de la Cre, seront croisées avec des souris dont l'allèle correspondant au gène Ucp1 sera flanqué par la séquence loxP. Bien que le modèle murin Ucp1-loxP n'est pas commercialisé à cette date, nous pourrons tout de même le générer nous-même en flanquant par transgenèse le gène Ucp1 avec deux séquences loxP (Nagy, 2000), puisque l'UQAM est équipée d'une plateforme de tansgénèse. Cela permettra, après deux générations, d'obtenir des souris homozygotes Ucp1-Knockout (KO) spécifiquement au niveau du foie. Ensuite, ces souris, ainsi que des contrôles non croisés et floxés au niveau d'Ucp1, seront soumis à une diète régulière, ou à une HFD classique, ou à une diète grasse enrichie en MCT, semblable à la M40. Tout au long de la diète, la prise de masse corporelle, la dépense énergétique, la consommation d'oxygène et l'activité thermique des animaux seront mesurées à l'aide de cages métaboliques. Cette stratégie expérimentale nous permettra de déterminer avec précision à quel point la thermogenèse hépatique (éventuellement) induite par les MCT à prévenir l'obésité et la stéatose hépatique.

Pour déterminer l'implication du GPR40/FFAR1 dans l'induction de la thermogenèse hépatique par les MCT, nous pourrons refaire un protocole de diète et des mesures métaboliques identiques appliqués, cette fois, à des souris dont l'expression hépatique du GPR40/FFAR1 aura été préalablement inhibée (par exemple) par la technique du SLiK (*somatic liver knockout*). Basé sur la technologie du CRISPR-Cas9, le SLiK, s'est avéré efficace pour inhiber l'expression de plusieurs gènes d'une manière spécifique au foie, chez des animaux adultes, pour un effet stable sur plusieurs semaines après le traitement (Jarrett *et al.*, 2017; Pankowicz *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2016c). Lors du SLiK, le système CRISPR/Cas9, conditionné dans des nanoparticules lipidiques ou un adénovirus (au fort tropisme hépatique), est administré par injection hydrodynamique dans la veine caudale, pour maximiser la spécificité au niveau hépatique de la délétion d'exons d'intérêt. Dans notre cas, il sera question de faire un KO de l'exon unique qui code pour le GPR40/FFAR1. Nous suggérons une telle technique pour sa rapidité et son faible coût.

4.2.2 Exploration plus élargie des effets bioactifs des MCFA médiés par GPR40/FFAR1 et GPR84

4.2.2.1 Est-ce que les MCFA stimulent la sécrétion des incrétines par les entérocytes ?

4.2.2.1.1 Survol des fondamentaux concernant les incrétines, et nouvelle hypothèse

Les incrétines sont des facteurs intestinaux circulants sécrétés immédiatement après un repas par des cellules endocrines de l'épithélium intestinal (Drucker, 2006; Gautier *et al.*, 2005). L'action immédiate des incrétines est de potentialiser la sécrétion d'insuline en réponse au glucose, ainsi que la vidange gastrique. À plus long terme, les incrétines ont aussi pour effet de favoriser la survie, la néogenèse et la prolifération des cellules β du pancréas (Drucker, 2006; Gautier *et al.*, 2005). Les deux incrétines les plus abondamment étudiées sont le *glucagon-like peptide-1* (GLP-1) et le *glucose-dependent insulinotropic polypeptide* (GIP), respectivement sécrétées par les entérocytes de type L de l'iléon et du colon, et les entérocytes de type K du duodénum (Drucker, 2006; Gautier *et al.*, 2005). Le peptide tyrosine-tyrosine (PYY), bien que sécrété par les cellules L de l'iléon et du colon en réponse à l'ingestion des aliments,

n'est pas consensuellement décrit comme une incrétine car il n'a pas d'action insulinotrope ; sa principale fonction consiste à réduire l'appétit (Woods & D'Alessio, 2008). GLP-1 et GIP se lient à leurs GPCR respectifs (GLP-1-R et GIP-R) présents à la surface des cellules β du pancréas pour induire l'élévation de l'AMPc et l'activation de la PKA aboutissant à l'inhibition du canal chimio-dépendent KATP. Or, pour rappel, l'inhibition du KATP entraine la dépolarisation de la membrane plasmique puis l'ouverture du canal voltage-dépendent au Ca²⁺ et donc l'entrée massive de ce cation qui entraine la fusion des vésicules sécrétoires insuliniques avec la membrane plasmique et donc la libération de l'insuline (Kushibiki et al., 2015). En parallèle, par un mécanisme dépendant de la PKA, les incrétines ont le potentiel de stimuler l'expression du gène codant pour la proinsuline, par les cellules β du pancréas (Wang et al., 2014). Ainsi, les incrétines favorisent dans l'immédiat et dans le long terme, la sécrétion de l'insuline induite par le glucose. Concrètement, pour résumer, les incrétines augmentent l'excitabilité des cellules β déjà stimulées par la hausse de la glycémie en vue d'en maximiser la sécrétion d'insuline, et elles augmentent le pourcentage des cellules β sécrétant l'insuline à des concentrations de glucose (même) en dessous du seuil classique de stimulation de la sécrétion d'insuline (MacDonald et al., 2002).

Quant aux effets des incrétines sur la néogenèse et la survie des cellules β , ils sont médiés par l'activation directe des voies PI3K/AKT et AMPc/PKA, et par la transactivation de la voie de l'*epidermal growth factor receptor* par GLP-1-R et GIP-R, aboutissant à l'activation de FOXO1, JNK et CREB qui inhibent l'apoptose et stimulent la prolifération de ces cellules (Buteau *et al.*, 2006; Drucker, 2006; Hui *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2004). En plus d'une action directe sur le pancréas, le facteur GLP-1 (et pas le GIP) sécrété dans la veine porte hépatique active des senseurs de glycémie qui acheminent un influx nerveux via le nerf vague afférant en direction du système nerveux central. Ce dernier émet à son tour un influx vagal efférent en direction du pancréas en vue de stimuler la sécrétion d'insuline (Drucker, 2006). En outre, GLP-1 participe plus largement au maintien de l'homéostasie du glucose par son action pléiotrope car son récepteur est aussi exprimé dans le foie, le système nerveux central, le cœur, et les tissus adipeux blanc et brun (González-García *et al.*, 2019). GLP-1 agit alors en inhibant directement la synthèse de glucagon par les cellules α du pancréas (Ramracheya *et al.*, 2018), en inhibant la prise alimentaire (Baggio *et al.*, 2004), et en activant la conversion hépatique du glucose en glycogène (Lopez-Delgado *et al.*, 1998).



Figure 4.1 : Effets pléiotropes du facteur GLP-1. GI (gastrointestinal) ; GLP-1 (*glucagon-like peptide 1*). (Drucker, 2006).

Par ailleurs, GLP-1 activerait la thermogenèse à en croire des études ayant révélé que l'activation pharmacologique du GLP-1-R induirait le brunissement du tissu adipeux blanc et l'activation de la thermogenèse par le tissu adipeux brun, en agissant directement sur ces tissus via un mécanisme dépendant de SIRT1 (Xu *et al.*, 2016a). En outre, une étude très élégante a révélé que GLP-1 aurait la possibilité de moduler la

thermogenèse et la balance énergétique dépendantes du système nerveux central (Beiroa *et al.*, 2014). Plus exactement, l'injection d'un agoniste sélectif du GLP-1-R (le liraglutide) par voie intracérébroventriuclaire dans le noyau ventromédial de l'hypothalamus (VMH) a induit une déphosphorylation de l'AMPK du VMH, activant les efflux nerveux sympathiques thermogènes de cette région hypothalamique. Dans le même temps, l'agonisme sélectif des GLP-1-R dans d'autres régions hypothalamiques (l'aire latérale, le noyau arqué et le noyau paraventriculaire) s'est traduit par une baisse de la prise alimentaire. Tous ces traitements ont, logiquement, entrainé une perte de poids (Beiroa *et al.*, 2014). Les souris de cette étude étaient nourries avec une diète régulière de type Chow. Plus récemment, grâce à un modèle de souris chez qui le *Glp-1-r* a été délété spécifiquement au niveau de l'hypothalamus (GLP-1RKD^{ΔNkx2.1cre}) et comparées à des souris non mutées, il a été confirmé que l'activité centrale de GLP-1 a le potentiel de ralentir les effets d'une diète obésogène de type HFD également, en favorisant la dépense énergétique (Burmeister *et al.*, 2017).



Figure 4.2 : Vue d'ensemble des effets thermogènes et anorexigènes de l'agonisme du Glp-1-r murin dans les régions hypothalamiques VMH, ARC, PVH et LHA. LHA (*lateral hypothalamus area*) ; PVH (hypothalamic *paraventricular nucleus*); DMH (*hypothalamic dorsomedial nucleus*) ; VMH (*hypothalamic ventromedial nucleus*) ; ARC (*arcate nucleus*) ; GLP-1-R (*glucagon-like peptide-1 receptor*). Selon Beiora *et al.* (2014).

Les incrétines sont donc des hormones favorisant la dépense énergétique et l'intégrité des fonctions pancréatiques, ce qui en fait des molécules bénéfiques contre l'obésité, la résistance à l'insuline, le diabète de type 2 et le syndrome métabolique.

Or, il est très intéressant de rappeler que la perception des nutriments par les entérocytes est le principal stimulus qui induit la sécrétion des incrétines (Drucker, 2006; Gautier *et al.*, 2005; Lim, 2009). Le glucose et les LCFA sont les principaux

stimulateurs de la sécrétion des incrétines, selon la littérature. Ces nutriments agissent en induisant la fermeture du canal K_{ATP} , la dépolarisation des membranes des cellules K et L et l'entrée de Ca²⁺ dans les cellules L et K. Le glucose induit cet enchainement d'événement en élevant les niveaux cellulaires d'ATP suite à sa propre oxydation. Les LCFA et les SCFA induisent cela via le GPR40/FFAR1 et le GPR120 qui réhaussent, en tant que récepteurs couplés à une protéine Gaq, les niveaux de Ca²⁺, et l'activité des voies AKT et des MAPK-ERK_{1/2}.

Par contre, il est surprenant de constater que l'induction des incrétines par les MCFA alimentaires, pourtant connus comme étant les meilleurs ligands du GPR40/FFAR1, n'a été que très peu étudiée. St-Onge et al. (2014) ont mesuré l'impact d'un petit déjeuner enrichi avec 20g de MCT ou de LCT, ingéré en 10 minutes par des hommes adultes en surpoids et à jeun, sur les niveaux circulants des hormones régissant l'appétit. Les auteurs ont effectué ces mesures à toutes les 15 minutes pendant les trois heures suivant ce petit déjeuner. Alors qu'ils ont démontré le potentiel « coupe faim » des MCT dont la consommation s'est traduite par une élévation relative des niveaux circulants de leptine et de peptide YY, les auteurs n'ont pas détecté de différences dans les niveaux sanguins de GLP-1 des participants durant les trois heures suivant leur consommation de MCT ou de LCT (St-Onge et al., 2014b). Cependant, cette étude ne permet absolument pas, selon nous, de conclure que l'ingestion de MCT n'induit pas la sécrétion des incrétines car le temps de demi-vie de ces dernières n'est que de 5 minutes chez les humains (2 minutes chez les rongeurs) (Deacon et al., 2000). Il est donc fort probable que les auteurs n'aient pas exploité la bonne fenêtre de temps pour la mesure du GLP-1 induit par les MCT.



Figure 4.3 : Voies de sécrétion de GLP-1 induites par le glucose et les lipides. (A) Mécanisme aboutissant à la sécrétion de GLP-1 en réponse au glucose. (B) Mécanismes induits par le GPR119, le GPR40/FFAR1, le GPR120 et la PKCζ aboutissant à la sécrétion de GLP-1 en réponse aux lipides et leurs dérivés comme l'OEA. La flèche rouge illustre notre hypothèse voulant que les MCFA pourraient aussi stimuler la sécrétion de GLP-1 via le récepteur GPR40/FFAR1. SGLT (*Sodium-glucose transport protein*) ; ATP (adénosine triphosphate) ; Na⁺ (cation sodium) ; ψ (potentiel de membrane) ; GLP-1 (*glucagon-like peptide-1*) ; K⁺ (cation potassium) ; Ca²⁺ (cation calcium) ; OEA (oléoylethanolamide) ; GPR (*G-protein coupled receptor*) ; PKA (protéine kinase A) ; MCFA (*medium-chain fatty acid*) ; LCFA (*long-chain fatty acid*) ; ERK (*extracellular signal-regulated kinases*) ; PKC (*protein kinase C*). Figure modifiée (Lim, 2009).

Nous émettons l'hypothèse qu'en étant perçus par le récepteur GPR40/FFAR1 des entérocytes, les MCFA, issus de l'hydrolyse intestinale des MCT, en abondance dans les lumières duodénales, iléales et cloniques, potentialiseraient la sécrétion des incrétines, favorisant de la sorte la sensibilité à l'insuline, la thermogenèse et la prévention comme la réduction de l'obésité.

4.2.2.1.2 Plan expérimental proposé pour évaluer l'implication de l'axe GPR40/FFAR1-incrétines dans la médiation des effets des MCFA sur le métabolisme

Dans un premier temps, nous pourrions vérifier notre hypothèse sur des cultures primaires d'entérocytes issus de souris de type sauvage et des souris de la souche Ffar1global knockout (GPR40/FFAR1-KO) (Alquier et al., 2009; Sartorius et al., 2015). La culture primaire des entérocytes est une procédure relativement simple et peu couteuse à réaliser. En bref, les régions intestinales correspondant au duodénum et à l'iléum seront prélevés des souris juste après leur sacrifice puis immédiatement digérés à la collagénase-XI, en s'inspirant d'un protocole ayant déjà été exécuté en vue de la caractérisation des mécanismes régulant la sécrétion de GLP-1 (Reimann et al., 2008). Les entérocytes totaux ainsi isolés seront mis en cultures puis exposés à des doses croissantes d'un mélange équimolaire de C8 et de C10, et aussi à des temps croissants. Nous mesurerons ensuite les concentrations de GLP-1 et de GIP sécrétés dans le milieu, à l'aide de Kits ELISA (GLP-1 ELISA-kit, et Rat/mouse GIP total ELISA, Millipore, USA). En guise de contrôle positif d'induction de la sécrétion de GLP-1 et de GIP par les entérocytes, un traitement au glucose combiné à la forskoline et à l'isobutyl-1methylxanthine sera inclus (Reimann et al., 2008). Ce protocole nous permettra de faire d'une pierre plusieurs coups, en vérifiant si les MCFA induisent bien la sécrétion des incrétines, avec quelle amplitude, dans quelle mesure le récepteur GPR40/FFAR1 est impliqué, et si les doses et les temps d'inductions optimaux sont cohérents avec des conditions physiologiques.

Si nous confirmons que les MCFA induisent la sécrétion des incrétines par un mécanisme dépendant du GPR40/FFAR1, il serait intéressant d'évaluer, dans un second temps, l'implication des incrétines dans les effets bénéfiques induits par les MCFA sur la sensibilité à l'insuline. Cela se ferait idéalement en deux temps, d'abord *in vitro* puis *in vivo*.

L'expérience qu'il est proposé de mener in vitro est schématisée dans la figure 4.4. Elle consistera à exposer des cultures primaires d'entérocytes (issus encore des souris de type sauvage et Gpr40/Ffar1-KO) aux MCFA quelques minutes, puis de remplacer le milieu de culture par du nouveau milieu sans MCFA. Après un temps correspondant au temps optimal (obtenu tel que décrit dans le paragraphe précédent) pour la sécrétion potentielle de GLP-1 et de GIP, le nouveau milieu sera supplémenté ou non avec 16.7mM de glucose (une forte dose activatrice de la sécrétion d'insuline), puis transféré vers des cultures de cellules INS1E en vue de mesurer leurs niveaux de sécrétion d'insuline en réponse à ce milieu. Cette expérience classique, inspirée notamment de Pujol et al. (2018), est un « test de sécrétion d'insuline en réponse au glucose (GSIS, pour glucose-stimulated insulin secretion) » appliqué à des cellules en cultures. Quant aux cellules INS1E, il s'agit d'une lignée cellulaire différentiée en cellule de type β pancréatique, avant une capacité conservée à sécréter de l'insuline en réponse à de hautes doses de glucose (Merglen et al., 2004; Pujol et al., 2018). Cette expérience in vitro permettra de savoir si les MCFA exercent un effet insulinotrope (en potentialisant la sécrétion d'insuline par les cellules β pancréatiques en réponse au glucose) indirect avec l'intermédiaire de l'activité du GPR40/FFAR1 intestinal, consolidant (ou non), l'hypothèse d'un axe intestinal MCFA-GPR40/FFAR1-incrétines.



Figure 4.4 : Procédure expérimentale préliminaire devant aboutir, *in-vitro*, à la suggestion d'un éventuel axe MCFA-GPR40/FFAR1-incrétines potentialisant le GSIS. Les explications relatives à cette figure sont détaillées dans le paragraphe 4.2.2.1.2. L'indication x minutes réfère au temps optimal d'induction, par les MCFA, de la sécrétion de GLP-1, et qui reste à déterminer. Ffar1/Gpr40 (*Free fatty acid receptor 1 / G-protein coupled receptor*) C8 (acide octanoïque, C8 :0) ; C10 (acide décanoïque) ; G (glucose) ; mM (milimoles par litre) ; GSIS (*glucose stimulated insulin secretion*).

Ensuite, pour étudier notre hypothèse in vivo, nous proposerons une stratégie expérimentale basée sur le même principe, réalisée directement sur des souris de type sauvage et des souris de génotype Gpr40/Ffar1-KO, non obèses, mâles et femelles, de 5 semaines d'âges. Cette stratégie expérimentale est schématisée dans la figure 4.5. En bref, ces souris Gpr40/Ffar1-KO (ainsi que leurs homologues de génotype sauvage) feront l'objet d'un gavage intragastrique avec une solution saline renfermant la concentration optimisée de C8 et de C10. Après un temps de latence correspondant au temps optimisé in vitro, les souris subiront un test GSIS inspiré de protocoles largement documentés (Pujol et al., 2018; Xiong et al., 2019), qui consistera à mesurer leur insulinémie à différents temps suivant l'injection par voie intraveineuse d'un bolus de glucose. Toutefois, un détail devra être pris en compte : il a déjà été démontré que les MCFA potentialisaient le GSIS en activant directement le récepteur GPR40/FFAR1 des cellules β du pancréas (voir section 1.8.2.1. paragraphe 2 de la thèse pour les détails) (Pujol et al., 2018). Autrement dit, le récepteur GPR40/FFAR1 a bien deux effets physiologiques qui pourraient ici être mutuellement confondants : Il gouverne la libération de GLP-1 au niveau intestinal, et il stimule directement le GSIS au niveau pancréatique. Sachant cela, l'usage des souris Gpr40/Ffar1-KO dans le protocole que nous proposons représenterait une limite méthodologique. En effet, il sera difficile de conclure quelle part du GSIS induit par les MCFA sera imputée aux incrétines et quelle part sera imputée à l'effet direct des MCFA sur le récepteur Gpr40/Ffar1 des cellules β du pancréas. En d'autres termes, si le GSIS décroît chez les Gpr40/Ffar1-KO nous ne saurons pas si c'est le fait de la perte de l'effet stimulateur direct des MCFA sur le pancréas, ou plutôt de la perte de l'éventuel axe intestinal GPR40/FFAR1-incrétines. Pour s'affranchir de ce facteur confondant, l'expérience (si elle est prometteuse) sera donc reproduite, tel que schématisé dans la figure 4.5, sur des souris dont le gène codant pour le Gpr40/Ffar1 sera invalidé spécifiquement au niveau des cellules β du pancréas peu avant l'expérience. Pour ce faire, il sera possible de générer des souris exprimant l'enzyme CreERT conditionnellement à l'expression de Pdx1 (pancreatic and duodenal homeobox 1) (Gu et al., 2002) et dont le gène Gpr40/Ffar1 sera flanqué des

séquences LoxP. L'injection de tamoxifène (à l'âge voulu) à ces souris Pdx1-CreERT X Gpr40/Ffar1-LoxP invalidera l'expression de Gpr40/Ffar1 au niveau de leurs cellules β pancréatiques (Gu et al., 2002). C'est alors que ces souris pourront faire l'objet d'un gavage aux MCFA immédiatement suivi d'un test de GSIS. Si l'éventuel effet insulinotrope du gavage des MCFA est (au moins partiellement) perdu en présence de ces inhibiteurs, et ce malgré l'absence de perte de fonction du récepteur Gpr40/Ffar1, alors l'hypothèse que les effets métaboliques des lipides à chaînes moyennes sont en partie médiés par les incrétines sera renforcée, *in vivo*. Ainsi, les résultats obtenus au terme des GSIS détermineront la contribution précise des incrétines sécrétées en réponse aux MCFA, dans la production d'insuline par le pancréas. Pour rappel, la figure 4.5 suivante propose une synthèse schématisée de ces expériences consistant à évaluer l'impact des MCFA sur le GSIS.



Figure 4.5 : Procédures expérimentales devant aboutir à la caractérisation d'un éventuel axe MCFA-GPR40/FFAR1-incrétines potentialisant les fonctions pancréatiques de sécrétion d'insuline. Les flèches bleues indiquent l'ordre chronologique des manipulations, les flèches rouges désignent des cas hypothétiques, et les flèches vertes représentent des processus documentés dans la littérature. I.P. (injection intrapéritonéale) ; I.V. (injection intraveineuse) ; WT (*wild type*) ; TMX (tamoxifène) ; KO (*knockout*) ; MCFA (*medium-chain fatty acids*) ; GLP-1 (*glucagonlike peptide 1*) ; GIP (*glucose-dependent insulinotropic polypeptide*) ; GSIS (*glucose stimulated insulin secretion*).

Dans un troisième temps, il serait intéressant d'évaluer l'implication des incrétines dans un éventuel axe intestin-cerveau médiant une partie des effets antiobésogènes et thermogènes des MCFA. Autrement dit, les MCFA de la lumière intestinale pourraient induire la sécrétion de GLP-1 qui agirait à son tour sur l'hypothalamus pour induire la thermogenèse et une balance énergétique favorable à une réduction de l'obésité. Suivant deux protocoles de diètes inspirés de ceux présentés en chapitre III (figures 3.1.A et 3.6.A), nous vérifierons cela en soumettant des souris non-obèses ou des souris

obèses insulinorésitstantes à une diète HFD classique ou à une diète hautement enrichie en MCT comme la M40, pendant une semaine à 10 jours (temps suffisant pour creuser une différence de masse corporelle significative selon la figure supplémentaire 3.1.A et la figure 3.6.B du chapitre III). Les groupes de souris sous diètes HFD et M40 (et bien sûr LFD en guise de contrôles) seront subdivisés en deux sous-groupes, un premier dont les souris se feront administrer quotidiennement de l'exendin(9-39)amide dans les régions hypothalamiques par injections intracérébroventriculaires, et un second pour l'injection de véhicule vide, durant toute la période de la diète. l'exendin(9-39)amide est un antagoniste inhibiteur du GLP1-R qui a déjà été testé avec succès sur les rongeurs et les humains (Green et al., 2005; Steinert et al., 2014). La masse des souris, leur dépense énergétique, leur consommation d'oxygène, leur thermogenèse hors activité physique et leur consommation alimentaire seront mesurées en continu à l'aide de cages métaboliques. Si le traitement à l'exendin(9-39)amide émousse (ne serait-ce que partiellement) les effets préventifs et curatifs de la diète M40 contre l'obésité (effets largement prouvés dans le chapitre III), notre hypothèse sera consolidée. Peut-être que ce protocole permettra même de découvrir que l'induction par la diète M40 des marqueurs de la thermogenèse dans le foie (constatée dans le chapitre III) pourrait être due en partie à l'action de GLP-1 sur l'hypothalamus, étant donné que ce dernier (et plus exactement le VMH) émet des projections sympathiques vers le foie (Uyama et al., 2004).

L'injection par voie intrapéritonéale de l'exendin(9-39)amide a des souris n'a pas du tout affecté leur comportement alimentaire, et chez les humains, son injection par voie intraveineuse n'a pas modifié la prise alimentaire non plus, bien qu'elle ait eu un léger impact sur le phénomène subjectif du désir de nourritures (Green *et al.*, 2005; Steinert *et al.*, 2014). Cela devrait être suffisant pour suggérer que l'exendin(9-39)amide ne traverse pas la barrière hémato-encéphalique puisqu'il n'antagonise pas l'action anorexigène du GLP-1 au niveau central. Toutefois, aucune étude n'a vérifié si l'exendin(9-39)amide injecté dans le SNS se retrouvait en circulation. Nous n'excluons donc pas la possibilité qu'il puisse se retrouver dans la circulation périphérique et les

résultats pourraient être dus à un possible effet pléiotrope de cet antagoniste du GLP-1-R. Pour s'affranchir de ce problème, si notre hypothèse est consolidée, un protocole de diète identique sera reconduit sur des souris GLP-1RKD^{Δ Nkx2.1cre}. Un tel protocole de diète, moins invasif que le précédent, nous permettrait en plus de prolonger le protocole de diète à plusieurs semaines, pour estimer l'importance de l'axe intestincerveau médié par GLP-1 dans la prévention et la réduction de la résistance à l'insuline par la diète M40 enrichie en MCT.

4.2.2.2 Caractérisation de l'impact des lipides à chaînes moyennes sur l'inflammation hépatique

4.2.2.2.1 Les risques potentiels sur la santé hépatique en lien avec l'activation du GPR40/FFAR1 par les MCFA

Dans le chapitre III, nous avons montré que l'induction par les lipides à chaînes moyennes du gène clef de la thermogenèse UCP1 dans le foie, et donc vraisemblablement du processus de la thermogenèse, dépendait au moins partiellement de l'activation du récepteur GPR40/FFAR1. Cette observation était en cohérence avec la forte affinité connue du récepteur pour les MCFA. Toutefois, il devenait dès lors nécessaire de se questionner sur les possibles effets secondaires négatifs d'un tel mécanisme sur le foie. En effet, le projet de développement commercial du fasiglifam (TAK-875), un agoniste sélectif du GPR40/FFAR1 ayant pourtant démontré un potentiel très prometteur dans la prise en charge du diabète de type 2 et de la résistance à l'insuline chez des sujets humains, a été interrompu après que ces derniers eurent présenté des niveaux circulants anormalement élevés de transaminases hépatiques suggérant une hépatotoxicité (Kaku et al., 2015). Cela a poussé les chercheurs à développer une version modifiée du fasiglifam, le MR1704 avec les mêmes effets antidiabétiques mais dont l'impact sur la santé hépatique n'est toujours pas encore documenté (Tsuda et al., 2017). Bien sûr, il n'est pour l'heure pas exclu que la détoxification du composé lui-même, et non son activité d'agoniste du GPR40/FFAR1, soient en cause dans cette hépatotoxicité. Mais ce précédent rapporté dans la littérature

nous commande de considérer avec précaution les risques hépatiques secondaires à la fonction signalétique des MCFA qui activent le GPR40/FFAR1.

En outre, une étude menée sur un modèle de souris a révélé que l'activation du GPR40/FFAR1 par l'acide linoléique conjugué favorisait le développement de la stéatose hépatique induite par celui-ci (Sartorius *et al.*, 2015). Rappelons, par ailleurs, qu'une étude a déjà démontré le potentiel aggravant des MCT sur la stéatohépatite induite par le fructose, tel que mentionné plus haut (chapitre I, section 1.8.2.1.) (Guimarães *et al.*, 2019).

4.2.2.2.2 Les risques potentiels sur la santé hépatique en lien avec l'activation du GPR84 par les MCFA

Le récepteur GPR84, également reconnu avec une haute affinité par les MCFA et connu pour être exprimé dans le foie (Gagnon *et al.*, 2018), pourrait aussi être activé au niveau hépatique par les diètes enrichies en MCT. Certes, la figure 3.3.H du chapitre III montre bien que l'induction d'*UCP1* hépatocytaire par les MCFA est inhibée en présence du DC260126 consensuellement présenté comme un antagoniste spécifique du GPR40/FFAR1 (Sun *et al.*, 2013). Mais puisqu'aucune étude n'a formellement démontré le contraire, il n'est pas à exclure que le DC260126 ait pu aussi antagoniser le GPR84 des hépatocytes testés, en guise de cible collatérale. Nous pourrions ainsi avoir sous-estimé l'implication du GPR84. Donc, il est tout à fait réaliste de supposer que les MCFA aient agi simultanément sur le GPR84 et sur le GPR40/FFAR1 hépatiques et hépatocytaires.

Or, l'activation potentielle du GPR84 par les MCFA n'est pas moins problématique, compte tenu du rôle pro-inflammatoire (évoqué dans la section 1.5.6., chapitre I, paragraphe 4) de ce récepteur. L'agonisme du GPR84 active le recrutement des macrophages ainsi que leurs processus de phagocytose et de sécrétion de chimiokines et de cytokines pro-inflammatoires (Recio *et al.*, 2018). De plus, il a été démontré que l'activation du GPR84 était fortement impliquée dans l'apparition des symptômes clefs de la stéatohépatite, soit la nécrose hépatique, l'infiltration hépatique des neutrophiles

et des macrophages, et la fibrose, en réponse à de violents traitements hépatotoxiques comme l'administration de tétrachloride ou la mise sous diètes déficientes en choline (Puengel *et al.*, 2018). En outre, dans une étude élégante menée *in-vivo* et sur des cocultures d'adipocytes et de macrophages, Nagasaki *et al.* ont révélé que dans le tissu adipeux blanc de souris obèses, l'expression du GPR84 était induite par TNF α et que son activation par les MCFA induisait la chute de l'adiponectine (Nagasaki *et al.*, 2012), ce qui est un marqueur d'une obésité inflammatoire et métaboliquement délétère.

4.2.2.2.3 Les lipides à chaînes moyennes sont-ils donc pro-inflammatoires ou anti-inflammatoires ?

Dans notre étude détaillée dans le chapitre III, nous avons certes démontré avec beaucoup d'enthousiasme que la consommation d'une diète grasse hautement enrichie en MCT, la M40, se traduisait par une quasi-disparition des gouttelettes lipidiques hépatiques, au contraire d'une diète grasse HFD stéatogène classique isocalorique. En revanche, selon la figure 4.6 (résultat non encore publié) ci-dessous, la diète M40 aussi se traduit par une infiltration massive de cellules lymphocytaires, sans doute des cellules de Kupffer résidentes, dans les foies de souris. Cela est démontré par la concentration importante de cellules lymphocytaires révélée par l'hématoxyline (figure 4.6.A), et l'expression significativement élevée du *culster of differentiation 68* (CD68, figure 4.6.B), un marqueur exprimé par tous les macrophages tissulaires (Holness & Simmons, 1993). En revamche, ni l'expression du gène $IL-1\beta$ ni celle de $Tnf\alpha$, deux cytokines pro-inflammatoires, n'étaient induites (figure 4.6.C&D). Cela pourrait signifier que les macrophages infiltrés dans les foies des souris soumises à la diète M40 n'étaient pas les macrophages de type M1 médiateurs des réponses inflammatoires classiques et des dommages hépatiques (Sica & Mantovani, 2012). Il pourrait plutôt s'agir de macrophages à polarité M2 qui tendent généralement à être antiinflammatoires, immunosuppresseurs et impliqués dans la réparation tissulaire et qui sont une importante source de la cytokine anti-inflammatoire Interleukine 10 (IL-10) (da Silva et al., 2015; Sica & Mantovani, 2012). Cette dernière possibilité serait d'autant plus cohérente que Geng *et al.* (2016) ont observé qu'une diète grasse chargée en MCT, semblable à notre diète M40, a non seulement prévenu l'induction de l'obésité et de la résistance à l'insuline, mais a également prévenu l'expression des marqueurs pro-inflammatoires hépatiques tout en élevant significativement les niveaux circulants d'IL-10 (Geng *et al.*, 2016). Rappelons également qu'il a été démontré que l'acide gras ω -3 α -linoléique, ainsi que les produits de son métabolisme par les bactéries lactiques de la flore intestinale, en présence d'interleukine 4 (IL-4), ont la capacité d'induire directement la différentiation des cellules macrophages dérivées de la moelle osseuse (BMDC) en macrophages de type M2 en partie via l'activation du GPR40/FFAR1, *in vitro* et *in vivo* (Ohue-Kitano *et al.*, 2018). Il semble évident que la littérature rapporte tout et son contraire au sujet de l'effet de l'activation des GPR récepteurs aux acides gras sur l'inflammation. Nos propres résultats préliminaires (figure 4.6) sont ambigus sur la question. La question qui se pose est donc de savoir si les fonctions signalétiques des MCFA se traduisent par une induction ou par une prévention de l'inflammation au niveau hépatique.

4.2.2.4 Hypothèse et procédure expérimentale pour répondre à la problématique

En conjuguant notre résultat préliminaire aux données de la littérature, nous émettons l'hypothèse que les MCFA retrouvés dans le foie suite à la consommation excessive de MCT entrainent le recrutement voire l'activation des macrophages par un mécanisme dépendant du GPR84, puis en entrainent la différentiation en macrophages de type M2 par l'agonisme du GPR40/FFAR1. Il se pourrait aussi bien que les MCFA induisent, de manière cyclique et répétée dans le temps, l'inflammation puis sa résolution en agonisant GPR84 et GPR40/FFAR1 respectivement. Ainsi, dépendamment du moment où les souris nourries avec des MCT sont sacrifiées, l'on pourrait y retrouver un phénotype pro-inflammatoire ou un phénotype anti-inflammatoire. Dans un autre contexte impliquant les acides gras polyinsaturés, sur un modèle murin surexprimant l'apolipoprotéine D (ApoD), une telle alternance de profils pro-inflammatoires et anti-

inflammatoires (sur un rythme trimestriel) a déjà été observée par notre équipe (Desmarais *et al.*, 2019), rendant notre supposition réaliste.

Pour vérifier notre hypothèse, dans un premier temps, nous pourrions nourrir de jeunes souris de 5 semaines d'âge (livrées à trois semaines d'âge après sevrage puis acclimatées deux semaines à l'animalerie, exactement comme les souris des cohortes A et B étudiées dans le chapitre III) sur une période d'un an avec des diètes de types M40 ou contrôle. À différents trimestres, des foies de souris issus des deux groupes seront digérés à la collagénase puis les macrophages (cellules de Kupffer) isolés du reste des cellules par centrifugation dans un gradient de percole suivant un protocole dont l'efficacité et le rendement sont bien démontrés (Aparicio-Vergara *et al.*, 2017). Il sera alors possible de déterminer la balance de polarisation M1 ou M2 de ces macrophages. Par exemple, cela pourrait être mesuré par un protocole d'immunofluorescence basée sur un marquage des macrophages avec des anticorps ciblant TLR4 et/ou le récepteur à l'IL-1, deux marqueurs membranaires des macrophages M1 (Sun *et al.*, 2017b), ainsi que CD163 et/ou CD206 qui sont deux marqueurs membranaires des macrophages M2 (Roszer, 2015; Sun *et al.*, 2017b).

Ensuite, en s'inspirant du protocole de Ohue-Kitano *et al.* (2018), l'on pourrait examiner plus directement l'effet immunomodulateur des MCFA en exposant des BMDC ainsi que des macrophages totaux hépatiques en cultures, à des doses physiologiques de MCFA, et en présence ou en absence d'antagonistes sélectifs de GRP40/FFAR1 puis de GPR84, pour évaluer leur polarisation sur la base des marqueurs membranaires et des cytokines qu'ils exprimeront. Cela renseignerait sur l'effet potentiel des MCFA sur la régulation de l'inflammation systémique. La même expérience pourra être reproduite sur des cultures primaires de cellules de Kupffer, facilement isolables (selon la procédure mentionnée dans le paragraphe précédent) (Aparicio-Vergara *et al.*, 2017), pour renseigner sur l'effet potentiel des MCFA sur le phénotype pro- ou anti-inflammatoire au niveau hépatique plus spécifiquement. Si nous confirmons que les diètes MCT et les MCFA favorisent un environnement antiinflammatoire en promouvant la différentiation des macrophages en macrophages de type M2, alors leur innocuité sur la santé hépatique sera confirmée. Par contre, il se pourrait aussi que l'on découvre que les macrophages hépatiques recrutés et activés par les diètes MCT sont polarisés vers un phénotype pro-inflammatoire, soit en continu ou à des périodes particulières, via des mécanismes dépendants d'un des deux GPCR (GPR84 étant le suspect le plus crédible). Dans ce cas-là, il serait intéressant d'optimiser notre manière d'administrer les diètes MCT pour en inhiber le potentiel inflammatoire sur le foie, tout en bénéficiant pleinement de leurs propriétés antiobésogènes et antistéatogènes. Par exemple, nous pourrions très efficacement évaluer sur des animaux l'effet d'une diète dont la masse grasse comportera à 12,5% des huiles essentielles (communes à toutes les diètes grasses), à 60,5% de l'huile MCT, et à 27% de l'huile de poisson Menhaden. À cette dose, il a été observé que cette huile de poisson fournit suffisamment d'acides gras ω -3 qui inhibent l'activité pro-inflammatoire des macrophages tissulaires en activant directement le récepteur GPR120 aux effets immunomodulateurs connus (Oh *et al.*, 2010).



Figure 4.6 : Impact des différentes diètes expérimentales sur l'inflammation au niveau hépatique. (A) Coupes histologiques, colorées à l'éosine et à l'hématoxyline, de foies de souris mâles nourries 10 semaines avec une diète LFD (10% kcal issus de LCT), une HFD (45% kcal issus de LCT), une M20 (20% kcal issus de MCT, et 25%

de LCT) ou une M40 (40% kcal issus de MCT et 5% de LCT). (B) Niveaux d'expressions transcriptionnels des gènes *CD68*, *IL-1b* et *Tnfa* dans les foies de souris. Résultats originaux non publiés. Les cercles verts entourent des zones de hautes densités nucléaires communément décrits comme de potentiels « foyers inflammatoires ». Le seuil de significativité statistique, calculé au moyen d'un test-t non pairé, est établi pour une *p-value* de 0,05. Le symbole (*) marque une différence statistiquement significative avec le contrôle LFD. *, p < 0.05. LFD (Low fat diet) ; HFD (High fat diet) ; M20 (HFD avec 20% de kcal issus de MCT) ; M40 (HFD avec 40% de kcal issus de MCT) ; *Cd68* (cluster of differentiation 68) ; *Il1b* (interleukine 1-bêta) ; *Tnfa* (tumor necrosis factor alpha) ; *Hprt1* (hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransférase).

4.2.3 Les effets possibles des MCT sur l'activité physique

4.2.3.1 Les effets antiobésogènes sont-ils induits en partie *via* la stimulation de l'activité physique spontanée ?

Il est bien connu que l'obésité et le manque d'exercice sont unis par un cercle vicieux, car la faible activité physique est tout à la fois causative et secondaire au développement de l'obésité (Pietilainen et al., 2008). Ce cercle vicieux est bien documenté aussi bien pour les humains que pour les animaux de laboratoire. D'une part, le manque d'exercice se traduit logiquement par une réduction de la dépense d'énergie hors repos (la NREE évoquée dans le chapitre I), induisant ainsi un débalancement anabolique obésogène. Une étude récente illustre cela en démontrant que, chez des souris de laboratoire, un espace vital réduit et faiblement enrichi favorise l'expansion du tissu adipeux viscéral (Roemers et al., 2019). D'autre part, l'inverse est aussi vrai, à savoir que l'obésité entraine elle-même une diminution de l'activité physique (Friend et al., 2017). En effet, comme le démontre la figure 4.7 générée par Friend et ses collaborateurs (2017), lorsque des souris sont soumises à une diète grasse obésogène, et bien que leur liberté de mouvement ne soit en aucun cas entravée, leur comportement exploratoire et les distances qu'elles parcourent sont substantiellement réduits. Quelques mécanismes causaux, établissant un lien intéressant entre les neurosciences et le métabolisme des lipides, sont proposés par la littérature pour expliquer cela. Dans leur étude, Friend et al. (2017) ont découvert que la diète grasse

obésogène entraine une réduction de la liaison de la dopamine au G_i -coupled D2 receptor (D2R) de la voie Indirect pathway medium spiny neurons (iMSNs) des neurones de projection du striatum (Friend *et al.*, 2017), la structure neuronale du système nerveux central directement responsable de la production des mouvements volontaires liés à la locomotion, la reproduction et l'exploration alimentaire.

En outre, il est désormais connu que, chez les souris, les diètes grasses riches en lipides saturés, contrairement aux diètes grasses à haut ratio lipides monoinsaturés/saturés, entrainent en plus de l'obésité et de son chapelet de complications métaboliques, une inflammation chronique au sein du noyau accumbens. Or, le noyau accumbens est la structure de l'hypothalamus impliquée dans la régulation de l'humeur et dans le renforcement positif des actions reliées au bien-être (Décarie-Spain *et al.*, 2018). L'action lipotoxique pro-inflammatoire des LCFA saturés au sein du noyau accumbens entraine un comportement de type dépressif caractérisé par un prolongement des temps d'immobilité physique, et l'induction d'une anxiété chronique qui conduit à la prostration, à la réduction du comportement exploratoire, et à la sédentarité (Décarie-Spain *et al.*, 2018). D'ailleurs, la figure 4.7.B de Friend *et al.* montre que, contrairement à celui des souris minces, le tracé des trajectoires des souris obèses est beaucoup moins complexe, et davantage confiné aux régions périphériques de leurs cages, ce qui est un indicateur typique de l'anxiété voire de la dépression (Lezak *et al.*, 2017).



Figure 4.7 : **Relation inverse entre l'induction de l'obésité par une diète riche en gras, et l'activité physique, chez des souris de la souche C57BL6/J.** (A) Évolution de la masse corporelle de souris minces soumises à une diète faiblement enrichie en gras (13% kcal issus de gras) ou très fortement enrichie en gras (60% kcal issus de gras). (B) Tracé des trajectoires (*track-plots*) des souris minces et obèses dans leur périmètre d'hébergement. (C) Distances parcourues par les souris obèses durant leur protocole de diète, en pourcentages par rapport aux souris contrôles minces. (Friend *et al.*, 2017).

Étant donné que les diètes les plus obésogènes (c'est-à-dire les diètes riches en LCT saturés lipotoxiques) inhibent l'activité physique, et au regard des propriétés non lipotoxiques des MCT, nous avons logiquement émis l'hypothèse que l'effet antiobésogène des diètes riches en MCT pourrait au moins en partie être imputé à la préservation voire à la stimulation de l'activité physique. Cette hypothèse était d'autant plus réaliste que les MCT de la diète, tel que largement décrit dans les chapitres précédents, sont de forts pourvoyeurs d'énergie pour l'organisme par leur haute propension à subir la β -oxydation. D'ailleurs, des études menées sur des athlètes non professionnels ont révélé que l'ingestion quotidienne de 6 grammes de MCT soutenue sur deux semaines suffit à augmenter significativement l'oxydation lipidique durant des exercices à intensité modérée, à prolonger la durée des exercices à fortes intensités (Nosaka *et al.*, 2009; Nosaka *et al.*, 2018), à améliorer l'endurance et à repousser le seuil de perception de la fatigue, bien plus efficacement que la consommation des LCT

(Nosaka *et al.*, 2018). En outre, la consommation des MCT a récemment été identifiée comme une stratégie nutritionnelle prometteuse pour le traitement de la sarcopénie (Abe *et al.*, 2019). La sarcopénie est une condition physiopathologique qui touche surtout (mais pas exclusivement) les ainés ayant une faible qualité de vie, et qui se manifeste par une perte de la masse et des fonctions des muscles squelettiques (Santilli *et al.*, 2014) résultant directement d'une accumulation de dysfonctions mitochondriales dans les muscles (Faitg *et al.*, 2018). Abe *et al.* (2019) ont pour leur part révélé que la consommation de 3g/jours de MCT pendant trois mois, par rapport aux LCT, augmentait la puissance des muscles jambiers de 48,1%, la performance des muscles de la déglutition de 27.8% et, plus intéressant encore, le score de mesure des activités de la vie quotidienne (AVQ) de 7.5% (Abe *et al.*, 2019).

D'un point de vue plus fondamental, Wang et ses collaborateurs (2018) ont confirmé, avec un nouveau mécanisme à l'appui, la capacité des MCT à améliorer l'endurance durant l'exercice. Ces auteurs ont démontré qu'une diète régulière Chow supplémentée avec 11.6g/kg de MCT, augmentait au niveau des muscles squelettiques l'expression des marqueurs clefs de la biosynthèse mitochondriale, comme PGC1 α , et des fonctions énergétiques mitochondriales, comme l'*ATP synthase subunit* 5 α (ATP5 α). La hausse de ces marqueurs était constatée en même temps qu'une augmentation des niveaux de phosphorylation de l'axe AKT-mTOR et de l'AMPK (un patron de résultats, du reste, très similaire à ce que nous avons obtenu aux niveaux hépatocytaire et hépatique dans les chapitres II et III), et d'une chute de l'expression du *Transforming growth factor* β , une cytokine de stress cellulaire régulant négativement la biosynthèse mitochondriale. Ces changements dans le catabolisme musculaire se sont traduits par une forte augmentation de l'endurance des souris lors d'un exercice de course contraignante sous haute température (Wang *et al.*, 2018a).

Toutes ces données de la littérature renforcent notre hypothèse susmentionnée, à savoir que les MCT, à l'exact opposé des LCT, favorisent les performances musculaires et l'activité physique, réduisant l'obésité. Pour vérifier cela, en guise de résultat préliminaire à d'autres études à venir, nous avons mesuré l'activité physique spontanée

des souris de la cohorte B étudiées dans la chapitre III. Pour rappel, il s'agit de souris de la souche C57BL/6 rendues obèses, insulinorésitstantes et stéatosées par une diète HFD classique riche en LCT (45% kcal issus de lard) pendant 10 semaines, puis soumises pendant 10 semaines supplémentaires (diet switch) soit à des diètes contrôles HFD et LFD, soit à l'une ou l'autre des diètes grasses enrichies en MCT partiellement (M20, 20% kcal issus de MCT) ou au maximum possible (M40, 40% kcal issus de MCT). Ce protocole de diète *ad-libitum* nous avait alors permis de démontrer le potentiel curatif de la diète M40 contre l'obésité, la stéatose hépatique et la résistance à l'insuline. Les mêmes souris ont fait l'objet, à la septième semaine post-diet switch (donc une semaine avant le GTT pour éviter toute influence du stress lié à ce dernier), d'une quantification de leur mouvement. Pour ce faire, elles ont été déposées individuellement dans des cages vides de 22,5 cm de longueur et 16,5 cm de largeur, puis filmées par le haut à l'aide d'une caméra pendant 10 minutes. Le suivi des trajectoires puis la quantification des mouvements, c'est-à-dire les distances parcourues et les vélocités moyennes des souris, ont été réalisés à l'aide du logiciel EthovisionXT14TM. Les cinq premières minutes ont été exclues des mesures car elles correspondaient aux temps nécessaires aux souris pour explorer puis s'acclimater au nouveau milieu, comme cela a déjà été documenté (Spink et al., 2001).

Les résultats (non publiés) présentés en figure 4.8 sont encourageants. Ils démontrent, conformément à la littérature d'abord, que les souris obèses soumises aux plus fortes doses de LCT, via les diètes HFD et M20, parcourent significativement moins de distances et sont significativement moins véloces que les contrôles LFD. Ensuite, les résultats montrent que les souris obèses ayant consommé la diète curative M40 présentent une activité physique exactement identique à celle des souris LFD. Cela suggère donc qu'il est bien raisonnable de supposer que l'effet antiobésogène des MCT dépend au moins en partie de leur effet positif sur l'activité physique.



Figure 4.8 : Mesure de l'activité physique spontanée de souris C57BL/6 préalablement obèses, stéatosées et insulinorésitstantes, soumises 7 semaines à une LFD, une HFD, une diète M20 ou une diète M40. Résultats originaux non publiés. Le seuil de significativité statistique, calculé au moyen d'un test-t non pairé, est établi pour une *p*-value de 0,05. Le symbole (*) marque une différence statistiquement significative avec le contrôle LFD et le symbole (#), avec la condition HFD. *, p < 0.05. LFD (*Low fat diet*) ; HFD (*High fat diet*) ; M20 (HFD avec 20% de kcal issus de MCT) ; M40 (HFD avec 40% de kcal issus de MCT) ; cm (centimètres) ; s (secondes).

S'il est désormais clair que l'amélioration des fonctions musculaires induites par les MCT peut être un mécanisme sous-jacent crédible (Abe *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2018a), il serait intéressant de comparer l'impact des MCT avec celui des LCT saturés sur l'homéostasie de la région hypothalamique. Nous pourrions, dans un premier temps, mesurer les niveaux d'expression des gènes pro-inflammatoires (comme $I\kappa\kappa\beta$, $IL-1\beta$ et TNF) dans le noyau accumbens des souris soumises aux diètes LFD, HFD et M40, aussi bien pour la cohorte A que pour la cohorte B. Conformément à l'étude de Décarie-Spain *et al.* (2018), la diète obésogène HFD devrait être associée à une hausse de ces marqueurs pro-inflammatoires. Au contraire, compte tenu de la forte propension des MCT de la diète à être oxydés dans le foie et de leur faible potentiel inducteur de la lipémie postprandiale, il serait attendu que la diète M40 n'entraine pas d'inflammation des régions hypothalamiques. Or, pour rappel de ce qui a mentionné dans le paragraphe

4.2.3.1, le fait de prévenir les mécanismes lipotoxiques pro-inflammatoires au niveau hypothalamique conduit à préserver une activité physique optimale chez les souris (Décarie-Spain *et al.*, 2018).

Pour aller plus loin et étudier plus directement l'impact des lipides à chaînes moyennes sur l'homéostasie des structures hypothalamiques, il sera utile de recourir à un protocole de micro-injections intracérébroventriculaires quotidiennes (pendant une période de l'ordre de la semaine) de véhicules salins supplémentés en LCFA (par exemple un mélange oléate :palmitate, 2 :1, m :m) ou en MCFA (un mélange équimolaire de C8 et de C10), en se basant sur un mode opératoire déjà documenté (Dragano et al., 2017). Les différents effets éventuels de ces traitements sur l'activité physique, le comportement alimentaire et la prise de masse corporelle seront évalués, et seront mis en parallèle avec les niveaux d'expressions des gènes inflammatoires hypothalamiques. Il est attendu que les MCFA induisent moins d'inflammation, et préservent l'activité physique. Une raison supplémentaire de supposer cela est la haute affinité des MCFA (comme largement évoqué plus haut) pour les récepteurs GPR40/FFAR1 et GPR84. Or, l'étude de Dragano et al. (2017) a révélé que l'injection dans l'hypothalamus du GW9508, un agoniste mixte du GPR40/FFAR1 et du GPR84, a entrainé une chute de l'expression du gène pro-inflammatoire $IL-1\beta$ et une hausse du gène anti-inflammatoire IL-10, en même temps qu'une diminution de l'efficience énergétique et une hausse de la dépense énergétique. De plus, ce traitement a entrainé une hausse, bien que non statistiquement significative, de l'expression des gènes Ucp1 et Ppargcla dans le tissu adipeux brun, par des facteurs de 50% et 100%, respectivement. Par contre, il convient de souligner que l'activité physique spontanée n'était pas modifiée chez ces souris (Dragano et al., 2017).

4.2.3.2 L'effet potentiel des MCT sur l'expression de l'irisine

Le lien entre l'activité physique et la thermogenèse par le brunissement du tissu adipeux a pris un tournant intéressant sur le plan fondamental au début des années 2010, avec la découverte de l'irisine (Bostrom *et al.*, 2012). Tel que brièvement évoqué dans

le chapitre I, l'irisine est une myokine sécrétée par les muscles squelettiques quelques minutes après l'exercice, et ses niveaux circulants sont proportionnels à l'intensité de l'exercice physique (Daskalopoulou et al., 2014). L'irisine sécrétée mâture est la forme clivée de la pro-hormone FNDC5 codée par le gène du même nom dont l'expression est principalement régulée à la hausse par PGC1a. L'irisine sécrétée stimule l'activation des fonctions thermogènes du tissu adipeux brun, via l'induction d'Ucp1 et de *Cidea*, ce qui ralentit significativement l'obésité et la progression de la résistance à l'insuline chez des souris soumises à une HFD (Bostrom et al., 2012). Chez des souris rendues obèses par une HFD (semblables aux souris de la cohorte B de notre étude présentée en chapitre III) l'administration d'irisine recombinante murine a entrainé, d'une manière dose-dépendante, une réduction spectaculaire de la masse corporelle, de la masse adipeuse, de la dyslipidémie de la résistance à l'insuline, et des marqueurs pro-inflammatoires (Niranjan et al., 2019). De plus, l'administration d'irisine a significativement accru les niveaux d'expressions transcriptionnels et posttranscriptionnels d'UCP1 dans les tissus adipeux blanc et brun, dans les muscles squelettiques, et aussi dans le foie (Niranjan et al., 2019). Vraisemblablement pour ces raisons, l'irisine est communément associée à une hausse de la dépense d'énergie et de la consommation d'oxygène, deux marqueurs d'une activité catabolique accrue (Bostrom et al., 2012; Daskalopoulou et al., 2014). Le mécanisme d'action moléculaire précis de l'irisine n'est pas encore connu et son potentiel récepteur est caractérisé depuis peu comme étant un récepteur de type $\alpha V/\beta 5$ -intégrine (Kim *et al.*, 2018). En outre, une étude très prometteuse menée sur des cultures primaires d'hépatocytes murins a révélé le potentiel antistéatogène de l'irisine. Dans cette étude, il a été démontré que l'irisine, via un nouveau mécanisme impliquant l'inhibition de l'arginine méthyltransférase (Prmt1), réduit l'expression des marqueurs clefs de l'inflammation, du stress oxydatif et de la DNL induits par le palmitate (Park et al., 2015).

Considérant le fait que la diète M40 riche en MCT a préservé l'activité physique spontanée des souris que nous avons étudiées (figure 4.8), et que, selon Wang *et al.* (2018), la consommation de MCT accroit l'activité musculaire du facteur PGC1α, il

est tentant de supposer que la consommation des MCT stimule la sécrétion d'irisine qui, à son tour, activerait la thermogenèse par les tissus adipeux blancs et beiges, voire même la thermogenèse hépatique, tout en prévenant la stéatose hépatique par l'inhibition de Prmt1. Pour vérifier cela, il faudra d'abord mesurer les niveaux d'expressions du gène Fndc5 dans les muscles squelettiques des souris des cohortes A et B (étudiées dans le chapitre III), et de mesurer les niveaux plasmatiques d'irisine. Si, chez les M40, aucune différence n'est observée par rapport aux contrôles, il faudra d'abord imputer cela au jeûne de 6 heures qu'ont subi nos souris avant leur sacrifice. En effet, le jeûne limite l'activité physique et les niveaux d'irisine qui peuvent choir en à peine 10 minutes après l'exercice (Daskalopoulou et al., 2014). Il sera alors nécessaire de reconduire l'expérience sur des souris vivantes de la lignée C57BL/6, obèses et non obèses, mâles et femelles, nourries ou non avec la diète M40 selon un mode ad-libitum puis soumises à une activité physique d'endurance immédiatement avant la collecte de leur sang en vue du dosage de l'irisine. L'activité physique d'endurance pourrait par exemple être réalisée à l'aide d'un essai classique de course sur tapis roulant motivée par impulsions électriques ou par le contact avec une brosse métallique (Southern et al., 2017). S'il est avéré qu'une consommation de MCT potentialise la sécrétion d'irisine en plus d'induire l'activité physique, le modèle de souris Fndc5(irisin precursor)-global knockout (Irisine-KO), développé récemment (Kim et al., 2018), serait d'une utilité précieuse. Des souris Irisine-KO et des contrôles non délétés, rendus préalablement obèses ou non (modèles d'études curatifs et préventifs) seront soumis à une HFD classique ou à une diète M40 pendant 10 semaines, puis leurs paramètres de poids, d'accumulation lipidiques hépatiques et de sensibilité à l'insuline seront évalués, ainsi que leur activité thermogène. Enfin, les marqueurs clefs de la thermogenèse dans le foie et les tissus adipeux blancs, beiges et bruns seront mesurés. Cela permettra de vérifier si l'activité physique, via la sécrétion d'irisine, est aussi un élément intermédiaire contributeur à la prévention et à la réduction de l'obésité et à l'activation des effets thermogènes par les MCT.

4.3 Synthèse des perspectives

Les résultats de cette présente thèse montrent que les MCT induisent une balance catabolique propice à la prévention et à la réduction de l'obésité, notamment en promouvant l'oxydation des lipides et la thermogenèse, par le foie majoritairement, et par le tissu adipeux blanc dans une moindre mesure. Leur effet bioactif sur le catabolisme serait au moins en partie médié par le récepteur GPR40/FFAR1. Les perspectives de recherche contribueront soit à confirmer soit à caractériser de manière inédite l'implication de processus physiologiques divers, comme la thermogenèse hépatique, la potentialisation de l'action des incrétines, la modulation centrale du métabolisme et du comportement alimentaire, et l'activité physique, dans les effets métaboliquement bénéfiques des MCT, tout en contribuant à raffiner leur utilisation afin de minimiser des risques éventuels, comme l'inflammation hépatique.

ANNEXE A

LE REMODELAGE DE LA FLORE INTESTINALE PAR LES TRIGLYCÉRIDES À CHAÎNES MOYENNES COMME POSSIBLE STRATÉGIE D'AMÉLIORATION DE LA SANTÉ MÉTABOLIQUE

GUT MICROBIOTA AND METABOLIC HEALTH: THE POTENTIAL BENEFICIAL EFFECTS OF A MEDIUM CHAIN TRIGLYCERIDE DIET IN OBESE INDIVIDUALS

Sabri Ahmed Rial, Antony D. Karelis, Karl-F. Bergeron and Catherine Mounier

Nutrients (MDPI). 2016 May 9; 8(5)

A.1.1 Résumé

L'obésité et les maladies métaboliques auxquelles elle prédispose, comme la stéatose hépatique non alcoolique (NAFLD) et le diabète de type 2 (T2D) connaissent une hausse inquiétante de leur prévalence. Il est bien connu que l'obésité est associée dans la plupart des cas à une multitude de comorbidités ayant pour effet d'altérer sévèrement la santé métabolique. Toutefois, il existe une sous-population de patients obèses jugés « métaboliquement sains » dont le pourcentage varie, selon les critères utilisés pour le diagnostic, de 3 à 5% de la population obèse adulte. Parmi divers autres facteurs, il est aujourd'hui largement démontré que le déséquilibre du microbiote intestinal (dysbiose intestinale) peut jouer un rôle causal dans la pathogenèse de l'obésité avec complications métaboliques telles que l'endotoxémie, l'inflammation intestinale et systémique, ainsi que la résistance à l'insuline. En outre, de récentes études ont également démontré que le maintien d'une symbiose intestinale optimale peut contribuer au maintien d'une bonne santé métabolique y compris chez des individus obèses. La présente revue de littérature propose du potentiel qu'ont les triglycérides à chaînes moyennes (MCT), par ailleurs connus pour promouvoir le catabolisme des lipides, la dépense d'énergie et la perte de poids, à améliorer la santé métabolique aussi en agissant directement l'intégrité et l'écosystème intestinaux. Nous émettons, pour finir, l'hypothèse selon laquelle les MCT alimentaires pourraient prévenir voire réduire la virulence des maladies métaboliques notamment via le remodelage du microbiote intestinal.

Mots clefs : obésité ; obèses métaboliquement sains ; obèses non métaboliquement sains ; syndrome métabolique ; stéatose hépatique non alcoolique ; microbiote intestinal ; *Bacteroidetes* ; *Firmicutes* ; endotoxémie ; lipopolysaccharides ; triglycérides à chaînes moyennes ; acides gras à chaînes moyennes.
A.1.2 Abstract

Obesity and associated metabolic complications such as non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and type 2 diabetes (T2D) are in constant increase around the world. While most obese patients show several metabolic and biometric abnormalities and comorbidities, a subgroup of patients representing 3 to 57% of obese adults, depending on the diagnosis criteria, remains metabolically healthy. Among many other factors, the gut microbiota is now identified as a determining factor in the pathogenesis of metabolically unhealthy obese (MUHO) individuals and in obesity-related diseases such as endotoxemia, intestinal and systemic inflammation, as well as insulin resistance. Interestingly, recent studies suggest that an optimal healthy-like gut microbiota structure may contribute to the metabolically healthy obese (MHO) phenotype. Here, we describe how dietary medium chain triglycerides (MCT), previously found to promote lipid catabolism, energy expenditure and weight loss, can ameliorate metabolic health via their capacity to improve both intestinal ecosystem and permeability. MCT-enriched diets could therefore be used to manage metabolic diseases through modification of gut microbiota.

Keywords : obesity; metabolically unhealthy obese; metabolically healthy obese; metabolic syndrome; non-alcoholic fatty liver disease; gut microbiota; *Bacteroidetes*; *Firmicutes*; endotoxemia; lipopolysaccharide; medium chain triglycerides; medium chain fatty acids

A.1.3 Introduction

Obesity has become an international public health problem with 2.1 billion people worldwide being overweight (body mass index (BMI) ≥ 25.0) and more than half a billion among them being obese (BMI \geq 30.0) (Ng *et al.*, 2014; Smith & Smith, 2016b). Obesity is now described as a pandemic with increased prevalence in both adult and child populations. Since the 1980s, the combined prevalence of obesity and overweight increased by 28% in adults and 47% in children (Ng et al., 2014; Smith & Smith, 2016b). Obesity is a multifactorial affection with broad etiology, and multiple comorbidities. Most of these comorbidities are thought to be the result of aberrant body fat distribution leading to the metabolic syndrome (Graffy & Pickhardt, 2016; Grundy, 2015; Haslam & James, 2005). This pathology is associated with an elevated waist circumference, a progressive state of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) (Graffy & Pickhardt, 2016; Haslam & James, 2005), insulin resistance, type 2 diabetes (T2D), some types of cancers (especially in women), hypertension, cardiovascular diseases, reproductive abnormalities, dyslipidemias, psychological affections (Hryhorczuk et al., 2013), and a severely reduced life expectancy (Elmaogullari et al., 2015; Haslam & James, 2005; Reuter et al., 2016). Obesity is also considered a risk factor for several other diseases such as chronic respiratory diseases (Cho & Shore, 2016) and arthritis (Haslam & James, 2005).

Some contributing factors for obesity progression are: unfavorable genetic determinants (Payab *et al.*, 2016), lack of physical activity (Waleh, 2016), socioeconomic status (Smith & Smith, 2016b), circadian cycle disturbance (Scott, 2015), sleep deprivation (Klingenberg *et al.*, 2012), hormonal dysregulation (Choudhury *et al.*, 2016), persistent organic pollutants (Lee *et al.*, 2014a) and alteration of the gut microbiota (Nova *et al.*, 2016; Patterson *et al.*, 2016). However, the most powerful inducer of obesity and its associated adverse metabolic effects remains, by far, inappropriate food intake (Drewnowski & Almiron-Roig, 2010). The modern prevalence of obesity and metabolic syndrome is likely due to the rise in consumption of energy-dense food, containing high amounts of fat and carbohydrates (Drewnowski & Almiron-Roig, 2010), especially in Western countries. In these countries, dietary fats typically account for 33% to 42% of dietary energy intake, with a rich proportion of long chain saturated fat (Drewnowski & Almiron-Roig, 2010). When the energy intake exceeds both the caloric needs of the body and its glycogen storage capacity, dietary carbohydrates and fats are first converted and stored as triglycerides (TG) in white adipose tissue (WAT) and, later on, in other tissues such as the liver (Ameer *et al.*, 2014; Strable & Ntambi, 2010). Sustained and abusive accumulation of lipids in the liver induces NAFLD (highly concurrent with obesity) which may result in lipotoxicity, steatohepatitis, hepatocyte cell death, fibrosis and eventually liver cirrhosis as well as hepatocarcinoma (Povero & Feldstein, 2016).

We aim here to overview the underlying causes of obesity and its associated metabolic abnormalities while paying special attention to a unique subset of the obese population: the metabolically healthy but obese (MHO) individuals. We will highlight the potential involvement of the gut microbiome as one of several contributors to the MHO status. We will finally introduce the idea of a medium chain triglycerides (MCT)-based dietary intervention with the aim of improving the metabolic state of metabolically unhealthy obese (MUHO) patients, either through modification of their intestinal health or by directly influencing lipid metabolism.

A.1.4 Etiology of obesity and associated metabolic complications

The current paradigm posits that fat accumulation leading to obesity results from an imbalance between energy intake and energy expenditure. Post-World War II food processing and marketing practices (quickly available energy-dense foods) and reductions in physical activity are the two main factors often blamed for the contemporary prevalence of obesity. As such, most treatment options involve creation of a negative energy balance, achieved by consuming fewer calories than energy expended. Alternatively, pharmacological and surgical therapies also exist (Kaila &

Raman, 2008). Nevertheless, complex interactions among heredity (Rankinen *et al.*, 2006), epigenetic imprinting (Waterland *et al.*, 2008), lifestyle, feeding behavior (McAllister *et al.*, 2009), as well as environmental (Kanayama *et al.*, 2005) and physiologic inflammatory factors (Maachi *et al.*, 2004; Trayhurn & Beattie, 2001) also contribute to the etiology of obesity.

A.1.4.1 Comorbidities related to obesity

Most obese individuals fall into the MUHO category and are at increased risk for several diseases. They suffer from a severely reduced life expectancy: a 5.8 years average decrease for men and 7 years for women (Grover *et al.*, 2015). The visceral adipose tissue (typically abundant in obese individuals) secretes pro-inflammatory cytokines (Maachi *et al.*, 2004; Trayhurn & Beattie, 2001) that are, in part, responsible for obesity-associated pathogenesis (Maachi *et al.*, 2004; Trayhurn & Beattie, 2001). The resulting metabolic syndrome defines a group of metabolic risk factors linked to health problems associated with overweight and obesity such as elevated visceral adiposity, larger waist circumference (>102 cm in men and >88 cm in women), hyper-triglyceridemia (>150mg/dL) (Grundy, 2015), reduced HDL (high density lipoprotein) cholesterol levels (<40mg/dL in men and <50mg/dL in women), elevated blood pressure (systolic > 130 mm Hg and/or diastolic > 85 mmHg) and high fasting glucose levels (Roberts *et al.*, 2013). A patient with at least three of these risk factors is currently diagnosed with the metabolic syndrome.

High levels of glycemia, associated with insulin resistance, are a hallmark of prediabetes and T2D, common diseases occurring in obese individuals suffering from the metabolic syndrome (Grundy, 2015). According to the most recent criteria, prediabetes is defined by a fasting glucose ranging between 100-125mg/dL or between 140-199mg/dL 2 hours *post-prandium*, while these two values often exceed 126mg/dL and 200mg/dL in T2D, respectively (Grundy, 2015). In addition, the latest medical updates indicate that 50-90% of patients with TD2 have a BMI > 25.0 (the overweight

threshold) while those with a BMI > 35 have a 20-fold higher risk of developing T2D than healthy lean patients (Kyrou *et al.*, 2000 (2014)).

Risk of cardiovascular diseases, including atherosclerosis, coronary artery disease, stroke and pulmonary embolism, is higher in obese patients (Poirier *et al.*, 2006a). Obesity is also associated with a large spectrum of liver abnormalities including NAFLD (Fabbrini *et al.*, 2010). Several additional comorbid disease risks are associated with obesity such as cholelithias, pancreatic failure sleep apnea, gynecological abnormalities, osteoarthritis, psychiatric illness as well as some types of cancer (breast, endometrial, prostate and colon) (Kaila & Raman, 2008).

A.1.4.2 Metabolically healthy but obese individuals (MHO)

There is a large body of evidence suggesting that not all obese individuals develop such important metabolic complications (Samocha-Bonet *et al.*, 2014). A unique subtype of obese individuals has been identified as MHO (Karelis, 2008). Despite excessive levels of body fat mass, MHO patients present higher levels of insulin sensitivity, a normal circulating lipid profile, no pronounced hepatic steatosis nor associated inflammatory state, no hypertension, and a lower visceral, muscle and hepatic fat content compared to MUHO subjects (Primeau *et al.*, 2011). Since there is no standard definition for the identification of the MHO phenotype, the true prevalence of MHO individuals in the obese population is currently unclear. Depending on the method and the cut-off point used for certain metabolic risk factors, the prevalence of MHO subjects may range from approximately 3 to 57% of obese adults (Velho *et al.*, 2010; Wildman *et al.*, 2008).

The favorable metabolic profile of MHO individuals has been associated with a lower risk of developing T2D or cardiovascular disease (CVD), and having a lower mortality risk compared to MUHO individuals (Plourde & Karelis, 2014). There is also evidence refuting the notion that MHO subjects are totally protected from metabolic diseases (Eckel *et al.*, 2015). The fundamental mechanisms underlying the different metabolic

profiles of MHO and MUHO individuals remain poorly understood (Loos, 2014). However, Berezina *et al.* showed that among patients with abdominal obesity, MHO phenotype was associated with a G45G Adiponectin genotype, while the T45T genotype for Adiponectin increased metabolic disorders risks (Berezina *et al.*, 2015). This observation is all the more interesting since Adiponectin is a potent modulator of insulin sensitivity (Kandasamy *et al.*, 2012). Also, in the latter decade, a consensus has emerged, which make the gut microbial population (also called the gut microbiota) a key determinant in the host metabolic profile (Hur & Lee, 2015; Patterson *et al.*, 2016). The gut microbiota should therefore be taken into consideration in dietary and clinical approaches, for both MUHO and MHO treatments.

A.1.5 The gut microbiota: a determining factor for metabolic state

A.1.5.1 Gut microbiota dysbiosis in obesity

Current estimations indicate that the human intestine is colonized by a large population of above 100 trillion microbial cells organized in several taxa and constituting the gut microbiota (Guinane & Cotter, 2013). The total biomass of the gut microbiota exceeds 1kg and is mainly concentrated in the large intestine, where about 10^{12} bacteria per gram of colonic tissue are found (Chow *et al.*, 2010). Such an important quantity of "foreign" cells implies a tightly regulated acceptance by the immune system of the host (Chow *et al.*, 2010). The gut microbiota plays a symbiotic role, ensuring several metabolic functions essential to the host. It is involved in the degradation of polysaccharides and oligosaccharides into simple metabolites such as short chain fatty acids (SCFA). These SCFA were recently found to promote intestinal impermeability (Kelly *et al.*, 2015) as well as hepatic sugar and lipid anabolism (den Besten *et al.*, 2013a; den Besten *et al.*, 2013b; Singh *et al.*, 2015). The gut microbiota is also an indispensable source of essential vitamins B and K (LeBlanc *et al.*, 2013). Gut individuals but also within the same individual under the influence of several physiologic and environmental factors such as antibiotic consumption, lifestyle and diet (Janssen & Kersten, 2015).

The alteration of gut microbiota is closely linked to tissue inflammation and to a broad range of metabolic abnormalities, including obesity and insulin resistance (Everard & Cani, 2013; Janssen & Kersten, 2015). First observations suggested a link between the gut microbiota and the metabolic state of the host (Cani *et al.*, 2007; Turnbaugh *et al.*, 2006). Several studies have since confirmed a direct implication of gut microbiota in obesity progression (Patterson *et al.*, 2016).

Backhed and colleagues first demonstrated that germ-free mice were protected against high fat and high sugar diet-induced obesity, via enhanced expression of hepatic and muscular Pgc-1 α (a PPAR coactivator) and activation of AMPK potentiating lipid catabolism (Backhed et al., 2007). Subsequently, Cani and collaborators established a close link between gut microbiota-induced "metabolic endotoxemia" and obesityrelated insulin resistance in mice. They established the paradigm of gut microbiotamediated metabolic endotoxemia inducing chronic low-grade of inflammation in the host. In obese mice, a dramatic change in caecum-resident bacteria characterized by a decrease in low lipopolysaccharide (LPS)-expressing bacterial taxa (such as Bifidobacteria) and concomitant elevation in high LPS-expressing taxa (gram-negative bacteria) was observed. This lead to increased concentration of circulating proinflammatory LPS (Cani et al., 2007). A prolonged high fat diet was also reported to induce physiologic high-grade inflammation, weight gain and T2D progression by an LPS-dependent gut microbiota-associated endotoxemia mechanism in mice (Backhed et al., 2007). In addition, it was shown that genetically obese ob/ob mice display a lower endotoxemia and caecal LPS content following the inactivation of CD14, a cell receptor involved in inflammation (Cani et al., 2007; Cani et al., 2008). Concomitantly, in a randomly recruited human male cohort, a link has been observed between circulating LPS and food intake (Amar et al., 2008).

In mice fed a high-fat diet, and in genetically obese *ob/ob* mice, suppression of gut microbiota via administration of a broad range of antibiotics resulted in a significant decrease of LPS caecal content. Consequently, fat accumulation and body weight were diminished, endotoxemia and inflammation at both systemic- and tissue-specific levels were blunted, and insulin sensitivity was improved (Cani *et al.*, 2008). Intriguingly, administration of antibiotics to livestock trough water and food is typically used to promote cattle and swine growth and weight-gain (Cazer *et al.*, 2014; Maron *et al.*, 2013). The mechanisms underlying this opposite effect are not known yet support a link between enteric bacteria and host metabolism, suggesting variable responses between animal species (Johnson *et al.*, 2016; Maron *et al.*, 2013; Van Boeckel *et al.*, 2015).

A dysbiosis induced by obesogenic factors adversely enhances intestinal permeability by modulating the expression of epithelial junction genes *zo-1* and *occludin* (Arslan, 2014; Cani et al., 2009). An optimal gut microbiota helps maintain intestinal barrier impermeability via the production of SCFA, which serve as metabolic precursors for colonocytes in normal physiologic hypoxia conditions (den Besten et al., 2013a; den Besten et al., 2013b; Kelly et al., 2015). Colonocytes require the catabolism of SCFA to potentiate the Hypoxia-inducible factor 1-dependent expression of key genes involved in biosynthesis (den Besten et al., 2013a; den Besten et al., 2013b; Kelly et al., 2015). This may explain why, in metabolic diseases such as obesity, an inappropriate microbiota adversely impacts intestinal permeability, leading to infiltration of bacterial LPS from gut lumen into intestinal epithelia, bloodstream and tissue (such as the liver) contributing to metabolic endotoxemia (Cani, 2012; den Besten et al., 2013a; den Besten et al., 2013b; Kelly et al., 2015). In fact, administration of antibacterial agents targeting caecal aerobic and anaerobic bacteria with high efficiency (namely norfloxacin and ampicillin) to mice fed a high-fat diet and ob/ob mice significantly enhanced their global glucose tolerance, decreased their fasting glycaemia and circulating LPS levels, and improved the secretion of Adiponectin (Membrez et al., 2008), known for its positive effects on insulin sensitivity

(Kandasamy *et al.*, 2012). The current model of obesity-associated endotoxemia posits that gut-derived LPS and free fatty acids activate M1 macrophages which, together with other immune cells, create a hepatic and physiologic inflammatory process sustaining the above-mentioned obesity-related comorbidities (Pereira & Alvarez-Leite, 2014).

Gut microbiota is now considered as a key factor of metabolic health (Arslan, 2014; Hur & Lee, 2015). The relative abundance of some bacterial phyla within the gut microbiota are associated with specific metabolic states, and subjected to the influence of diets (Turnbaugh et al., 2006). In fact, quantitative identification of bacteria using the 16S ribosomal RNA gene showed that obesity is associated to a notable decrease in the relative abundance of Bacteroidetes vs Firmicutes (from a proportion of 40:60 in lean patients or non-obese mice down to a proportion of 20:80) (Delzenne & Cani, 2011; Ley et al., 2005; Turnbaugh et al., 2006). Interestingly, this ratio is similarly decreased in *ob/ob* mice, in mice subjected to obesogenic and diabetogenic diets, as well as in obese human subjects (Abdallah Ismail et al., 2011; Clarke et al., 2012; Ley et al., 2005). Moreover, within these two superkingdoms, bacterial subpopulations are themselves submitted to specific changes reflecting metabolic health, diet and antiobesity medical interventions such as bariatric surgery-induced weight loss (Delzenne et al., 2011a; Delzenne et al., 2011b; Furet et al., 2010). These changes are diverse and still not well established (see Delzenne and Cani for a detailed review (Delzenne & Cani, 2011)).

While these observations established a definitive link between gut microbiota disturbance and metabolic diseases progression, it is still unclear which one of the two events induces the other. This question was addressed by several microbiota transplantation experiments (Blaut, 2015; Hur & Lee, 2015). The transplantation of fecal microbiota from obese mice and obese patients into germ-free lean mice transformed the lean mice into obese mice, while the germ-free mice receiving microbiota from lean mice did not show any metabolic symptoms related to obesity or insulin resistance (Blaut, 2015; Ridaura *et al.*, 2013; Turnbaugh *et al.*, 2006; Turnbaugh

et al., 2009). These findings revealed a microbiota-mediated transmissible effect of diets and metabolic status, demonstrating that gut microbiota is not simply a collateral unit modulated by metabolic diseases but an active and potent modulator of the metabolism. The gut microbiota may have therefore a role in the determination of metabolic status.

A.1.5.2 Correlation of MHO metabolic status with gut microbiota profile

To date, very few animal studies described a clear role for gut microbiota in the establishment of the MHO phenotype. Serino et al showed that different cohorts of mice issued from the same C57BL6 genetic background became either diabetic or resistant to diabetes and metabolic disorders despite being fed the same obesogenic high-fat diet. Compared to diabetic mice, resistant mice showed higher insulin sensitivity, lower inflammation, improved intestinal impermeability (in the ileum, caecum and colon) and lower adipogenesis (Serino et al., 2012). Moreover, the metabolic profile of resistant mice was similar to the metabolic profile observed in mice fed a high fat diet supplemented with gluco-oligosaccharidic fibers. Oligosaccharidic fibers are commonly used to prevent high fat diet-induced endotoxemia, dysbiosis and obesity (Neyrinck *et al.*, 2012). Interestingly, the resistant mice harbored a distinctive gut microbiota. The gut microbiota of the diabetic mice, in comparison with resistant mice, was characterized by a 20% decrease in the abundance of Firmicutes to the benefit of Bacteriodetes, mainly resulting from a dramatic decrease of the *lachnospiraceae* bacterial family. Within the *Bacteroidetes* phylum, the family of S24-7 bacteria was specifically increased (3-fold). In addition, compared to the diabetic mice, the microbiota of resistant mice presented an important decrease of the helicobacter genus, while actinobacteria remained stable (Serino et al., 2012). The authors suggested that the gut microbiota could represent a "signature of the metabolic phenotype independent of differences in host genetic background and diets". This suggestion is consistent with the results of a recent study performed in the brown bear

(Ursus arctos) (Sommer et al., 2016). The bear is a mammal well known to accumulate very large amounts of adipose fat during the summer; developing hyperlipidemia while remaining metabolically healthy and resistant to atherosclerosis (Arinell et al., 2012). Sommer and colleagues showed that, during summer, bears harbored a different gut microbiota composition than during winter. Summer microbiota was enriched in *Firmicutes, actinobacteria* and, in a lower proportion, enriched in proteobacteria while being depleted in *Bacteroidetes* (Sommer et al., 2016). Moreover, the abundance of several other bacterial families was also seasonally modulated. Interestingly, the transplantation of summer or winter microbiota from bear intestines to germ-free mice revealed a microbiota-dependent transmissible seasonal metabolic status as mice receiving summer microbiota showed a significant elevation of adiposity and body weight gain but a better glucose tolerance and a lower circulating TG level, suggesting an improved cardiometabolic state (Sommer et al., 2016).

Completely ignored previously, the fungal subdivision of the gut microbiota (or "mycobiota") has recently been revealed as a determinant of human metabolic state. As for bacteria, its specific composition seems to distinguish MHO from MUHO (Mar Rodriguez *et al.*, 2015). For example, Rodriguez and collaborators showed that obese patients with relative abundance of *Eurotiomycetes* >1% in their gut, showed improved fasting insulinemia, insulin resistance index and circulating LDL-cholesterol levels (Mar Rodriguez *et al.*, 2015).

There is a definite correlation between MHO status and intestinal flora. Gut microbiota remodelling could therefore be considered as a strategy to ameliorate metabolic health. Hence, we believe that a switch from MUHO into MHO metabolic state may be possible following gut microbiota remodelling, and that dietary interventions (such as those using prebiotic or bioactive nutrients) may help in this process.

A.1.6 MHO and MUHO: from classical dietary interventions to a MCT-based one?

Obese individuals have a lower success rate of maintaining weight loss after one year compared to non-obese individuals (McGuire *et al.*, 1999). This high risk of weight regain may lead to a pattern of weight cycling (McGuire *et al.*, 1999), and this may be associated with metabolic complications as well as CVD and mortality (Field *et al.*, 2009; Hamm *et al.*, 1989). In addition, significant weight loss can increase the levels of persistent organic pollutants (POPs) in the bloodstream (Chevrier *et al.*, 2000; Hue *et al.*, 2006) and may offset the beneficial effects of weight loss. In support of this idea, a recent study showed that obese subjects with the highest POP blood levels after weight loss suffered from a delay in the improvement of lipid and liver toxicity markers (Kim *et al.*, 2011). Therefore, health professionals may want to favor a metabolically healthy state instead of focusing on weight loss.

A.1.6.1 Weight management in MHO subjects

Several studies have examined the effect of lifestyle interventions, including diet and/or exercise training in MHO individuals. These have led to contradictory findings. Some have shown that, compared to MUHO, the metabolic profile of MHO individuals after weight loss did not improve following weight loss (Kantartzis *et al.*, 2011; McLaughlin *et al.*, 2002; Shin *et al.*, 2006) while other studies have reported an improvement of several metabolic risk factors (Cui *et al.*, 2015; Dalzill *et al.*, 2014; Janiszewski & Ross, 2010; Liu *et al.*, 2013a). For example, a 9-month intensive lifestyle intervention program that consisted of Mediterranean diet nutritional counselling and high intensity interval training was associated with a reduction of metabolic risk factors (e.g. blood pressure, fasting glucose level) (Dalzill *et al.*, 2014). Furthermore, weight loss following laparoscopic adjustable gastric banding in MHO patients was associated with an improvement of insulin sensitivity levels after 6 months (Sesti *et al.*, 2011). However, a significant decrease in insulin sensitivity was observed after weight loss in a different cohort of MHO individuals (Gilardini *et al.*, 2012; Karelis *et al.*, 2008). Finally, MHO women may lose less weight than MUHO subjects after 3 months on a low fat diet (Evangelou *et al.*, 2010). Based on the current evidence, it appears difficult to prescribe an optimal lifestyle intervention program to both MUHO and MHO individuals.

A.1.6.2 The metabolic protective potential of medium chain triglycerides (MCTs)

A.1.6.2.1 MCTs as bioactive lipids

One angle of attack against metabolic diseases is the modification of the quality of dietary lipids. Such a nutritional strategy may be based on the consumption of "bioactive lipids", such as mono-unsaturated or poly-unsaturated lipids, phytosterols, and free or esterified medium chain lipids (Nagao & Yanagita, 2008, 2010). We will emphasize our review on the metabolic benefits of medium chain free fatty acids (MCFA) and medium chain triglycerides (MCT).

Dietary medium chain fatty acids (MCFA) range between 6-10 carbon-chain lengths, including hexanoate (C6:0), octanoate (C8:0) and decanoate (C10:0). Large amounts of MCFA are found, in the form of MCT, in coconut and palm kernel oils where they account for more than 50% of total lipids (Babayan, 1987; Bach & Babayan, 1982). They are also found in smaller amounts in bovine milk, where they can reach 14-15% of the total lipid mass depending on cow breeds, types of pasture and seasonal conditions (Jensen, 2002). MCT differ from long chain triglycerides (LCT) by several physicochemical characteristics such as their smaller molecular size. MCT are hydrolyzed both faster and more extensively during digestion. Most of the remaining non-hydrolyzed MCT are readily absorbed by intestinal cells (Bach & Babayan, 1982). In addition, MCFA show greater solubility in aqueous media while remaining capable of passive, non rate-limiting diffusion across cell membranes as a result of their relative short chains (Babayan, 1987; Bach & Babayan, 1982; Marten *et al.*, 2006; Nagao &

Yanagita, 2008, 2010; Papamandjaris *et al.*, 1998). MCFA show a low affinity for anabolic enzymes (such as diglyceride acyltransferase) therefore undergoing minimal re-esterification, a process necessary for *de novo* synthesis of TG. Once absorbed during digestion, most of MCFA and MCT are transported through the portal system directly to the liver with minimal mobilization of chylomicrons while long chain fatty acids (LCFA) are packed in chylomicrons prior to their shipment to the periphery mainly via the lymphatic system (Babayan, 1987; Bach & Babayan, 1982; Nagao & Yanagita, 2008, 2010; Papamandjaris *et al.*, 1998). Finally, in the liver, MCFA are preferentially metabolized to generate energy (Noguchi *et al.*, 2002). In fact, MCFA are known to enter cells passively before crossing mitochondria membranes, independently of the availability of the rate-limiting carnitine palmitoyltransferase 1 (CPT-1) transport system, to fuel the β -oxidation and ATP-generating pathways (Marten *et al.*, 2006; Papamandjaris *et al.*, 1998), induce thermogenesis and reduce *de novo* lipogenesis (Akpa *et al.*, 2010).

Because of these properties, MCT have been used for decades to overcome many metabolic and digestive abnormalities such as pancreatic insufficiency, fat malabsorption, impaired lymphatic chylomicron transport, severe hyperchylomicronemia, and total parenteral nutrition. MCTs are also used in preterm infant formulas (Marten *et al.*, 2006).

A.1.6.2.2 MCT-supplemented diets prevent obesity

Using chick embryo hepatocytes, we have previously demonstrated, that free nonesterified hexanoate and octanoate significantly decrease insulin and T3 (triiodothyronine)-induced fatty acid synthase (FAS) expression and activity (Akpa *et al.*, 2010). Activity of FAS, a key enzyme of *de novo* lipogenesis, is positively regulated in the post-prandial state by several hormones (such as insulin, ghrelin and T3) and nutrients (dietary lipid and carbohydrate derivatives) (Ambati *et al.*, 2010; Kersten, 2001), and is an important contributor to obesity and NAFLD (Ameer *et al.*, 2014; Berlanga *et al.*, 2014a). We and others have demonstrated that MCFA inhibit binding of transactivating receptors on the T3 response elements of *FAS* and *Acetyl-CoA carboxylase (ACC)* promoters (Akpa *et al.*, 2010; Goodridge *et al.*, 1998; Roncero & Goodridge, 1992; Thurmond *et al.*, 1998). Using LO2 hepatocytes, Wang and collaborators showed that the induction of cellular steatosis by LCT (esterified oleate and palmitate) is reversed by addition of either octanoate or decanoate. MCFA treatment shifts cells from global lipid anabolism to lipid catabolism and downregulates main *de novo* lipogenesis-activating transcription factors (Liver-X-receptor alpha and Sterol regulatory element binding protein-1), the lipogenic enzymes (ACC and FAS) and enzymes involved in fatty acid-uptake (Cluster of differentiation-36 and Lipoprotein lipase) (Wang *et al.*, 2016a).

The propensity of MCFA to be catabolized rather than esterified, highlights their metabolically beneficial potential. Several years ago, it was shown in rats that replacement of dietary LCT by octanoate-based MCT led to a significant attenuation of alcoholic steatosis associated with a decrease in *de novo* TG synthesis an adiposity, as well as elevated lipid oxidation (Lieber et al., 1967). Therefore, MCT-supplemented diets constitute a promising tool against adipogenic and steatogenic diseases. Feeding healthy rats with MCT-containing diets vs diets containing LCT greatly decreases fat deposition without affecting whole-body protein content and assimilation (Ling et al., 1986). Consumption of MCT is safe in regards to toxicological considerations and has been sanctioned by the FDA (Food and Drug Administration) for over 20 years (Marten et al., 2006; Traul et al., 2000). Interestingly, dietary MCT promote post-prandial energy production. A single dose of MCT ranging between 5 and 50g or a weeklong diet containing 40% MCT-fat systematically leads to elevated post-prandial oxygen consumption and thermogenesis, increased total lipid oxidation, higher energy expenditure and diminished energy storage in comparison with LCT administered under identical conditions (Dulloo et al., 1996; Hill et al., 1989; Ishizawa et al., 2015; Nagao & Yanagita, 2010; Scalfi et al., 1991; Seaton et al., 1986). Importantly, the propensity of MCT/MCFA to be degraded by oxidation is also observed in obese individuals (Binnert *et al.*, 1998; Seaton *et al.*, 1986).

Long-term replacement of LCT with TG composed of esterified MCFA and LCFA induces a measurable body fat loss without any impact on energy intake and global metabolism (Nagao & Yanagita, 2010; Nagata et al., 2004; Nagata et al., 2003). These specific TG, produced from the transesterification of MCT and LCT (S-MLCT) are interesting compounds because of their higher smoking temperature making them more appropriate for cooking purposes than simple mixtures of MCT and LCT. S-MLCT display a "L-M-L"-type structure (TG with LCFA in sn-1 position, MCFA in sn-2 and LCFA in sn-3) are preferable substrates for pancreatic enzymes and are therefore highly digestible (Nagao & Yanagita, 2010; Nagata et al., 2004; Nagata et al., 2003). Feeding healthy young volunteers for 3 months with either S-MLCT or LCT-enriched liquid formulas (1040 KJ/day) led to a bodyweight increase from the baseline in both groups (Matsuo et al., 2001). Interestingly, diets supplemented with S-MLCT induced a lower increase in body fat mass compared to the LCT supplemented diets (+10% for S-MLCT vs +30% for LCT) (Matsuo et al., 2001). The general metabolic profiles between the two groups were not different with the exception of glycemia (S-MLCT= 924 vs LCT= 853 mg/100ml) (Matsuo et al., 2001). A clear link was concurrently established between the propensity of MCT to increase thermogenesis and their previously reported capacity to reduce diet-induced adiposity and body weight-gain (Noguchi et al., 2002; Tsuji et al., 2001). Wistar rats submitted to a single oral gavage of 1g MCT or LCT showed significant elevation in oxygen consumption concomitantly with elevated thermogenesis (1.5 Kcal/6h for MCT vs 0.8 Kcal/6h for LCT) (Noguchi et al., 2002). Another study showed that feeding rats with a diet containing 10% MCT during 6 weeks diminished body fat mass by decreasing subcutaneous and intra-abdominal adiposity compared to a diet containing 10% LCT, suggesting that dietary-MCT lowered body fat mass by inducing thermogenesis (Noguchi et al., 2002). Interestingly, MCT also lower caloric intake, compared to LCT, by improving satiety (St-Onge *et al.*, 2014a; St-Onge et al., 2003c). Octanoate, which constitutes most of the MCT used in dietary interventions, was suggested to be the main co-substrate of the Ghrelin Oacetyltransferase enzyme, involved in the activation of the powerful orexigenic peptide hormone Ghrelin (Lemarie *et al.*, 2015; Lemarie *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2016c). However, an acute diminution of food intake induced by the consumption of MCT oil is associated with an elevation of Leptin, a hormone with a well-known anti-orexigenic effect (St-Onge *et al.*, 2014a). These unsolved discrepancies between different studies highlights the necessity to better understand the molecular effects of MCT and their physiologic implications (Lemarie *et al.*, 2016).

Consistent observations related to anti-obesity effects of MCT were generated through animal and human clinical studies. Daily consumption (for 12 weeks at breakfast) of bread supplemented with 14g S-MLCT (produced by a transesterification of MCT and LCT) led, in comparison with control LCT, to a mild but significant decrease in body weight, and a decrease in subcutaneous and visceral adiposity as well as in total cholesterol level. However, the other metabolic and anthropometric parameters did not significantly vary (Kasai et al., 2003). The impact of MCT consumption on bodyweight is noticeably variable depending on studies and diet protocol designs. Women on a one-month diet where 30% of total energy was supplied by MCT displayed improved fat oxidation and energy expenditure compared to women on LCTcontaining meals, and showed a tendency towards decreasing body weight (St-Onge et al., 2003a). Interestingly, studies suggested that the catabolic effects induced by the dietary MCT may depend on BMI. In humans, MCT consumption for 4 weeks induced energy expenditure, fat oxidation and body weight loss inversely proportional to BMI (St-Onge & Jones, 2003). A recent observation has been also made on the impact of MCFA diets on cardiac functions (Airhart et al., 2016). Compared to LCFA, a 2-week administration of a 38% fat diet containing mostly MCFA positively altered plasma lipids and potentially improved cardiac function as well as insulinemia in adult type 2 diabetics. However, this diet did not significantly impact cardiac TG load or cardiac steatosis (Airhart et al., 2016).

Nevertheless, the consumption of MCT is systematically associated with higher energy expenditure compared to LCT. Solid evidences support the feasibility of using MCT preparations for nutritional trials against obesity, considering their sources, their flexible use and their safety. Compared to soybean oil (providing high amounts of LCT), coconut oil, which is the most easily obtained source of MCT, improves (in synergy with exercise) the cardiometabolic and anthropometric profiles (including waist circumference) of women presenting unhealthy abdominal obesity (Assuncao et al., 2009). However, coconut oil contains other compounds such as antioxidant polyphenols also known to improve metabolic profile by lowering LDL and VLDL while increasing HDL (Assuncao et al., 2009; Rimbach et al., 2009). St-Onge and collaborators demonstrated that consumption of a combination of MCT, phytosterols and omega-3-enriched flaxseed oil for 1 month compared to olive oil or beef tallowbased diets, led to improvement in plasma lipid profile in both healthy and overweight women as well as in MHO men (Bourque et al., 2003; St-Onge et al., 2003b). In addition, MCT oils can be incorporated into a weight loss program without any adverse effects on metabolic health (St-Onge et al., 2008). Table 1 summarizes the main studies that have revealed the antiobesity potential of MCT.

Consistent with these observations, a recent meta-analysis of randomized controlled trials, combining a broad spectrum of publication resources, showed that MCT administered for 3 weeks or more reduced body weight (-0.51 Kg average), waist circumference (-1.46 cm average), hip circumference (-0.79 cm average), total body fat, total subcutaneous fat and visceral fat in comparison with LCT and despite high heterogeneity (Mumme & Stonehouse, 2015). Such observations strongly support the relevance of using MCT to modulate body weight and metabolic profile in MUHO patients.

A.1.6.2.3 MCT-supplemented diets improve gut microbiota and intestinal health

MCT are known for their antimicrobial properties. MCT, as well as their constituent MCFA, when provided by maternal milk (along with endogenous long chain unsaturated monoglycerides), exerted antimicrobial effects on the gastro-intestinal tract of suckling neonates and contributed to reduce pathogen transmission (Isaacs, 2001; Rios-Covian *et al.*, 2016; Schanler *et al.*, 1986). Moreover, MCT and MCFA were also shown to reduce proliferation of certain species of *Malassezia*, an infectious fungus widespread in hospitals (Papavassilis *et al.*, 1999).

Kono and collaborators demonstrated that MCT could prevent LPS-mediated endotoxemia. Rats were fed MCT or corn oil (a source of LCT) by daily gavage for 1 week, prior to an intravenously acute dose of endotoxic LPS. Interestingly, while LPS injection led to mortality in corn oil-fed animals, this mortality was prevented in MCTfed rats (Kono *et al.*, 2003a). Furthermore, in contrast with the corn oil/LPS group, the MCT/LPS group showed a lower liver injury and inflammation as revealed by a significant decrease in CD14 and tumor necrosis factor alpha (TNF- α) expression in Kupffer cells. In parallel with this, while the corn oil/LPS combination induced a significant increase of intestinal permeability compared to corn oil without LPS, the MCT/LPS combination was associated with a significant improvement of intestinal permeability (Kono *et al.*, 2003a). In addition, MCT gavage prevented intestinal atrophy (a current problem occurring during parenteral nutrition) and massively reduced (10-fold) the bacterial fecal content (Kono *et al.*, 2003a). This study showed that MCT administration prevented CD14-activation dependent endotoxemia mediated by LPS, a model consensually associated to obesity and metabolic syndrome.

Most studies on juvenile models use piglets because of their similarities with humans during intestinal development (Dierick *et al.*, 2004; Jacobi & Odle, 2012; Zentek *et al.*, 2011; Zentek *et al.*, 2013). MCT supplements can be used as alternatives to antibiotics against certain types of porcine colitis (Dierick *et al.*, 2004; Kono *et al.*, 2010a; Kono *et al.*, 2010b). MCT-fed piglets had a better gastro-intestinal health, with improved

intestinal apoptotic index and mucosal turnover, and lowered intraepithelial lymphocyte infiltration (reflecting reduced local inflammation and diminished immune response) compared to controls (Dierick et al., 2004; Jacobi & Odle, 2012). Furthermore, piglets fed with MCT supplements display a marked modulation of microbial gastric and intestinal populations (Decuypere & Dierick, 2003; Dierick et al., 2004; Jacobi & Odle, 2012). This contributed to a decrease in intestinal inflammation and to an improvement of gut health and integrity (Liu, 2015) with a direct impact on the gut bacteria from Gram-positive (low LPS) and Gram-negative (high LPS) subdivisions (Decuypere & Dierick, 2003). Another study showed that dietary organic acids (OA) and MCFA changed the gut microbiota of weaning piglets (Zentek et al., 2013). MCFA were shown to reduce the pH of the digesta because of diminished bacterial acid production. OA and MCFA altered the population distribution of Bacteroidetes/ Porphyromonas/ Prevotella phyla and Clostridia/ Streptococcus genus in a tissue specific manner (stomach, jejunum, ileum and colon). MCFA specifically modulated the bacterial populations in specific regions such as jejunum and colon by promoting the growth of Escherichia/ Hafnia/ Shigella bacteria and Clostridia genus (Zentek et al., 2013). Combining SCFA and MCFA may constitute a potent tool for the management of optimal gut microbiota. This combination as well as other sources of MCT including coconuts oils, functional mixed oils, or purified MCT oils may be therefore useful for remodelling MUHO gut microbiota and improving metabolically unhealthy obesity. Table 2 summarizes these advances.

A.1.7 Synthesis and conclusion

This review aimed to highlight several aspects underlying the condition of obese subjects, which can be either metabolically unhealthy obese (MUHO) or metabolically healthy obese (MHO). While a panel of criteria serves to define the MUHO state, those defining metabolically healthy obesity remain the subject of current discussions. We underline the necessity of better defining the potential role of gut microbiota in the establishment of MUHO or MHO states. Moreover, we believe that gut microbiota structure may not only serve as a biomarker of those metabolic states, but can also be subjected to a diet-induced remodelling, modifying in turn the metabolic status of patients (MUHO vs MHO or lean state). Dietary MCT, taken alone or with other supplements (such as prebiotics, probiotics, organic acids, etc.) could be used as antiobesity interventions, in regards to their capacity to prevent intestinal permeability/endotoxemia by remodeling gut microbiota, and to prevent unhealthy storage by improving the lipid catabolism/anabolism balance. Figure A.1.1 illustrates this concept.

A.1.8 Acknowledgments

The authors are grateful to Dr Rodolphe Soret and Quentin Escoula (UQAM, Canada) for suggestions, corrections and advice. Finally, authors are grateful to SERVIER Medical Art creators for allowing free access to their images bank, which was used to construct Figure A.1.1 (www.servier.fr/smart/banque-dimages-powerpoint).

A.1.9 Author contributions

SAR, ADK, KFB, and CM conceived, designed, revised and illustrated the ideas and the manuscript, and all approved its final version.

A.1.10 Conflicts of interest

The authors declare no conflicts of interest.

A.1.11 Figure legends

Figure A.1.1 : Crosstalk between gut, liver and peripheral metabolic tissues under 4 metabolic states. Under condition of healthy leanness (A) an optimal relative abundance of LPS-expressing vs non-expressing bacteria contribute to gut impermeability, low intestinal and hepatic inflammation, and nonobesogenic/steatogenic nutrient supply. Under MUHO conditions (B), an elevation in the relative abundance of LPS-expressing bacteria (Gram-negative) induces LPS infiltration and leads to altered intestinal barrier integrity, local inflammation, liver injury and endotoxemia. At the same time, a high fat and carbohydrate supply contributes to adiposity, hepatic steatosis and peripheral insulin resistance. In MHO subjects (C), despite an adiposity sustained by a rich diet, a balanced gut microbiota would contribute to maintain intestinal and systemic metabolic health, prevent endotoxemia, and lower hepatic injury and peripheral insulin resistance. Our hypothetical model (D) suggests that diet MCT supplementation for MUHO subjects may facilitate a shift towards an MHO-like profile by improving lipid catabolism and lowering adiposity in part, but also by remodelling the gut microbiota into a metabolically beneficial structure. SCFA: short chain fatty acids; FA-U: Fatty acid uptake; AT: adipose tissue; DNL: de novo lipogenesis; SM: skeletal muscle; MUHO: metabolically unhealthy obese (or obesity); IR: Insulin resistance; β-ox: beta-oxidation; MHO: metabolically healthy obese (or obesity); MCT: medium chain triglycerides; MCFA: medium chain fatty acids; LPS: lipopolysaccharides; VLDL: very low density lipoproteins.





A.1.12 Table legends

Table A.1.1: Antiobesity effects of MCT and MCFA. MCT: medium chain triglyceride; MCFA: medium chain fatty acid; DNL: de novo lipogenesis; TG: triglyceride; BMI: body mass index; LDL: low density lipoprotein; HDL: high density lipoprotein; Peptide YY: peptide tyrosine tyrosine.

Table A.1.2: Antimicrobial and gut-managing effects of MCT. M. sympodialis:Malassezia sympodialis; M. furfur: Malassezia furfur; LPS: lipopolysaccharide; TNBS:2,4,6-trinitrobenzene sulphonic acid; MPO: myeloperoxidase.

Table	A.1.1
-------	-------

Model	Main reported effects for MCT or MCFA	References
Hepatocyte	Downregulated expression of genes involved in DNL and fatty acid uptake; promoted lipid catabolism; reduced steatosis; prevented deleterious lipid accumulation	(Akpa <i>et al.</i> , 2010; Roncero & Goodridge, 1992; Wang <i>et al.</i> , 2016a)
Rat	Lowered TG accumulation in the liver; reduced alcoholic steatosis	(Lieber et al., 1967)
Rat	Decreased body weight gain and body fat mass; lowered fat accumulation and visceral adiposity; did not affect protein assimilation nor metabolism	(Ling et al., 1986; Noguchi et al., 2002)
Rat	Resulted in a higher induction of oxygen consumption and thermogenesis	(Noguchi et al., 2002)
Human	Significantly increased postprandial oxygen consumption, energy expenditure, and fat oxidation, in a MCT dose-dependent manner and at a greater extend for lower BMIs	(Dulloo <i>et al.</i> , 1996; Hill <i>et al.</i> , 1989; Mori <i>et al.</i> , 2015; Scalfi <i>et al.</i> , 1991; Seaton <i>et al.</i> , 1986; St- Onge <i>et al.</i> , 2008; St-Onge <i>et al.</i> , 2003a; St Onga & Janag 2003)
Human	Decreased global adiposity, body fat, and whole- body subcutaneous adipose tissue loss, waist circumference; significantly lowered rate of variation of body fat percentage	(Kasai <i>et al.</i> , 2003; Matsuo <i>et al.</i> , 2001; St-Onge <i>et al.</i> , 2003c)
Human	Did not improve global adiposity	(St-Onge <i>et al.</i> , 2003a)
Human	Did not elevate postprandial circulating TG; did not modulate glucose response, insulinemia and circulating TG levels; lowered LDL/HDL ratio, total and HDL-cholesterol; improved cardiometabolic profile	(Assuncao <i>et al.</i> , 2009; Kasai <i>et al.</i> , 2003; St-Onge & Jones, 2003; St-Onge <i>et al.</i> , 2003b; St-Onge <i>et al.</i> , 2014a)
Human	Promoted rise in leptin and peptide YY	(St-Onge <i>et al.</i> , 2014a)

Table A.1.2

Model	Main reported effects	References
Malassezia	Supressed growth of M. sympodialis and M. furfur	(Papavassilis <i>et al.</i> , 1999)
Rats	Prevented acute LPS administration-induced mortality, liver injury, liver inflammation, gut impermeability and injury; blunted LPS-induced endotoxemia	(Kono <i>et al.,</i> 2003a)
Rats	Significantly blunted TNBS- induced colitis; improved both colonic MPO activity and colonocytes-expressed inflammatory markers	(Kono <i>et al.</i> , 2010a)
Rats	Improved gut integrity; modulated immune response to LPS; improved intestinal secretion of IgA	(Kono <i>et al.</i> , 2004)
Piglets	Lowered intestinal pH, in synergy with OA; modulated several gut microbial taxa, potentially preventing postweaning diarrhea	(Zentek <i>et al.</i> , 2013)

ANNEXE B

LA CONTRIBUTION DE LA LIPOGENESE DE NOVO HEPATIQUE DANS LA PROGRESSION DE LA STEATOSE HEPATIQUE NON ALCOLLIQUE

ROLE OF LIPOGENESIS AND LIPID DESATURASES IN NON-ALCOHOLIC FATTY LIVER DISEASE

Mohamed Amine Lounis, Sabri Rial, James M. Ntambi and Catherine Mounier

Springer. Book chapter. Editor name : James Ntambi. 2015 ; 143-164

A.2.1 Résumé

La stéatose hépatique non alcoolique (NAFLD) est une condition pathologique largement répandue et qui se caractérise par une accumulation excessive des triglycérides au sein des cellules hépatiques. La NAFLD est une maladie à large spectre allant de la simple stéatose bénigne et réversible à la stéatohépatite non alcoolique (NASH) qui est associée à des dommages hépatiques, de l'inflammation, voire même à de la fibrose hépatique. La NAFLD contribue en outre à l'apparition de symptômes aussi divers et variés que la résistance à l'insuline, le stress du réticulum endoplasmique et l'inflammation. L'augmentation du captage des acides gras par le foie, un déficit dans l'oxydation des acides gras, l'inhibition de la sécrétion des VLDL, de même que l'emballement de la voie de la DNL, sont autant de dérèglements métaboliques qui contribuent, peu ou prou, à la survenue puis à la progression de la NAFLD. Cette dernière est d'ailleurs très souvent diagnostiquée parmi les patients obèses dont le bilan énergétique est, par définition, positif. Dans des conditions où l'apport en énergie est supérieur à l'énergie dépensée, l'excès de carbohydrates alimentaires est converti en triglycérides par la voie de la DNL. Dans le présent chapitre, nous proposons une revue de la littérature récente relative au lien unissant la voie de la DNL à la progression de la NAFLD. Plus particulièrement, nous proposons de rendre compte des preuves scientifiques impliquant plusieurs désaturases lipidiques dans la NAFLD. Il sera question, en particulier, de l'enzyme stéaroyl CoA désaturase 1, et des deux enzymes delta 5 et delta 6 désaturases, impliquées respectivement dans la biosynthèse des acides gras de type oméga 3 et oméga 6.

Mots clefs : Stéatose hépatique non alcoolique (*NAFLD*) ; stéatose hépatique résistance à l'insuline ; lipogenèse ; gouttelettes lipidiques ; Stéaroyl CoA désaturase 1 (*SCD1*) ; Delta 5 désaturase ; Delta 6 désaturase

A.2.2 Abstract

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is a clinico-pathological change characterized by the accumulation of triacylglycerol (TG) in hepatic lipid droplets (LD). NAFLD can range from a simple steatosis to Non-alcoholic steatohepatitis (NASH) characterized by hepatic injury, inflammation, and eventually fibrosis. NAFLD can also be associated with insulin resistance (IR), ER stress, oxidative stress and inflammation. The cause of NAFLD is due to modification of various metabolic pathways including increased fatty acid (FA) uptake and/or reduced FA oxidation, decreased VLDL secretion and increased de novo lipogenesis (DNL). NAFLD is often observed in obese patients where energy is in excess and energy expenditure is low. In these conditions, most of carbohydrates are converted into TG through DNL. We aim here to present the most recent studies demonstrating the key role of DNL in NAFLD development. A special focus will be made on desaturases especially the stearoyl CoA desaturase 1, a central enzyme implicated in fatty liver disease as well as on the delta 5 and delta 6 desaturases, two enzymes involved in the synthesis of omega 3 and omega 6 fatty acids.

Keywords : Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) ; Hepatic steatosis ; Insulin resistance ; Lipogenesis ; Lipid droplet ; Stearoyl CoA desaturase 1 (SCD1) ; Delta 5 desaturase ; Delta 6 desaturase

A.2.3 Non Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) and Associated Pathologies

NAFLD is a major public health issue due to its high prevalence worldwide estimated to be 20-30 % of the total population (Milic & Stimac, 2012), and increasing to 57-74 % among obese patients (Angulo, 2002). It is a clinico-pathological change characterized by the accumulation of TG in hepatic LD (Teli et al., 1995). NAFLD is characterized by the presence of cytoplasmic LD in more than 5 % of the hepatocytes or by hepatic TG content exceeding the 95th percentile for lean and healthy who do not have any history of alcohol consumption, no viral infection or autoimmune liver disease (Cohen et al., 2011; Fabbrini et al., 2010; Stefan & Haring, 2011). TG accumulation in NAFLD is probably due to the modification of various metabolic pathways including increase in fatty acid (FA) uptake (Donnelly et al., 2005), reduction in FA oxidation (Fromenty et al., 2004) or VLDL secretion (Donnelly et al., 2005) or finally increase in DNL (Postic & Girard, 2008b). Liver histology can range the disease from simple steatosis (NAFLD) (>5 % fat infiltration, with or without minimal inflammation) to non-alcoholic steatohepatitis (NASH) characterized by hepatocyte injury (ballooning degeneration in presence or not of Mallory bodies), inflammation and eventually fibrosis (Neuschwander-Tetri & Caldwell, 2003) (Fig.A.2.1). Simple steatosis is thought to be a relatively benign state, whereas NASH represents the form of NAFLD that could potentially progress to cirrhosis and the following complications such as hepatocellular carcinoma (HCC). Day and collaborators were the first to describe the "two hit hypothesis" as a model for NAFLD-progression. The "first hit" was defined as a hepatocellular lipid accumulation (steatosis) resulting from an imbalance of cellular uptake and combustion. The "second hit" was defined as an additional inflammation (NASH) resulting from an imbalance of pro- and antiinflammatory factors (Day & James, 1998). For many years it was considered that patients with "simple" steatosis (NAFLD) show very slow or no histological progression, while NASH patients can exhibit histological and clinical progression to cirrhotic-stage disease associated with all the known complications of liver insufficiency (Musso *et al.*, 2011). However, a recent study provides evidences that all forms of NAFLD significantly increased the risk of cirrhosis and HCC probably as the result of various allelic variants of genes involved in hepatic LD formation (Yki-Jarvinen, 2014).

Accumulation of lipids (especially diacylglycerols (DAG) and ceramides) in liver is associated with the installation of hepatic IR (Samuel et al., 2010). The relationship between hepatic DAG accumulation and hepatic IR could be attributed to the activation of PKCE (Frangioudakis et al., 2009; Samuel et al., 2004; Samuel et al., 2007). Increased PKCE directly reduced the insulin-induced tyrosine phosphorylation of the insulin receptor substrate (IRS-2) by the insulin receptor kinase, leading to the reduction in insulin-stimulated hepatic glycogen synthesis and insulin-inhibition of neoglucogenesis. Supporting the key roles of PKCe and DAG, hepatic knockdown expression of PKCE (Samuel et al., 2007) or DGAT2 (diacylglycerol acyltransferase-2) (Choi et al., 2007) using antisense oligonucleotides (ASO) protects mice from hepatic IR induces by high fat diet (HFD). A role for ceramides in hepatic IR was also suggested as reduced levels of ceramides improves IR in animal models of diet induced obesity. In this study, the authors suggested that the effect of ceramides on insulin signaling is mediated by a direct interaction of these lipids with the protein kinase B (Chavez & Summers, 2012). However, a more recent study showed an opposite result. The TLR-4 knockout mice showed that despite previous evidences, the TLR-4 toll like receptor signaling is not involved in ceramides synthesis and that IR is not dependent of ceramides accumulation but on DAG implicating the activation of a PKCE /IRS2dependent signaling pathway (Galbo et al., 2013). Another feature associated with NAFLD is the apparition of ER stress. The ER plays an important role in the synthesis, folding and trafficking of proteins. Accumulation of lipid in the liver induces the dysfunction of ER, causing the accumulation of unfolded proteins therein, triggering an unfolded protein response (UPR) (Puri et al., 2008). Recent data indicates that UPR is activated in NAFLD playing an important role in the development and the progression of the disease (Boden et al., 2011; Feng et al., 2003). Saturated fatty acids

such as palmitate activate the UPR in liver characterized by a preferential induction of PERK signalling (Cao et al., 2012; Wei et al., 2006). Conversely, short-term exposure to unsaturated fatty acids attenuates ER stress in setting the excess of palmitate (Fu et al., 2012; Listenberger et al., 2003a). UPR is characterized by the arrest of protein synthesis through the phosphorylation of eIF- 2α , by the activation of proteosomal protein degradation and by the activation of the ATF4-CHOP-GADD34 axis. The latter allows cells to adapt to ER dysfunction. When cells fail to adapt, JNK is activated leading to inflammation and apoptosis (Kaplowitz & Ji, 2006). In both NAFLD and NASH, an increased eIF-2a phosphorylation is observed. However, in NASH, the downstream recovery pathway (ATF4-CHOP-GADD34) is not activated. Consequently, JNK phosphorylation is increased. This may explain at least in part the apparition of inflammation in the NASH state (Puri et al., 2008). Oxidative stress is also activated in NAFLD. It is the result of a serious imbalance between limited antioxidant defenses and an excessive formation of both reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) (Robertson et al., 2001). Free fatty acids (FFA) are metabolized via the mitochondrial β –oxidation pathway and the tricarboxylic acid (TCA) cycle. Accelerated β -oxidation, due to an excess of lipid in the liver as observed in NAFLD, induces an excessive electron flux in the electron transport chain of the mitochondria increasing ROS production and leading to mitochondrial dysfunction (Rolo et al., 2012). NASH is also characterized by an elevated hepatic DNL resulting in an increased production of malonyl-COA. In turn, malonyl-CoA inhibits the carnitine palmitoyltransferase-1 (CPT-1) leading to a decrease of long chain fatty acids import into the mitochondria, and consequently a reduction in β -oxidation. Consequently, TG accumulates in the liver aggravating the steatosis (Rolo *et al.*, 2012; Vega et al., 2000). The severity of NAFLD correlates with the expression of tumor necrosis factor- α (TNF α) receptor while the production of TNF α is dependent on FA concentration (Crespo et al., 2001). In addition, activation of the TNF receptor increases the expression of SREBP1c, inducing hepatic DNL and lipid accumulation (Endo *et al.*, 2007). In ob/ob mice, secretion of TNF α and IL6 activates the hepatic

Kupffer cells promoting hepatotoxicity, IR and steatohepatitis (Li & Diehl, 2003; Odegaard *et al.*, 2008).

A.2.4 Characteristics of the Hepatic Lipid Droplets

NAFLD is characterized by the presence of LD in hepatocytes. LD are dynamic cellular organelles found in most cells and particularly in cells specialized in lipids storage such as white and brown adipose tissue, hepatocytes and enterocytes. LD cores contain neutral lipids predominantly TG or sterol esters. These organelles may also include retinyl esters, waxes and ether lipids (Brasaemle & Wolins, 2012; Farese & Walther, 2009; Martin & Parton, 2006). These lipids are surrounded by a phospholipid monolayer coated with a large number of proteins. They regulate many aspects of LD biology including the synthesis and the mobilization of lipids as well as their interaction with other cellular organelles. LD could either be formed de novo or derived from existing LD by fusion (Long *et al.*, 2012). De novo formation of LD in eukaryotes occurs from the ER (Jacquier *et al.*, 2011; Jacquier *et al.*, 2013) where neutral lipids are synthesized (Buhman *et al.*, 2001).

The precise mechanism of LD formation remains however mostly unanswered. The most widely accepted model proposed for LD biogenesis lasts in three different steps (Wilfling *et al.*, 2014) (Fig.A.2.2).

(a) Neutral lipids are synthesized in the ER and accumulate within the bilayer. Neutral lipids are highly mobile in the bilayer and may spontaneously aggregate on the basis of their thermal fluctuations and interactions with membrane proteins or other lipids.

(b) Once the local concentration of neutral lipid reaches a crucial threshold, an intramembrane lipid accumulation occurs leading to the formation of lens.

(c) As lens accumulates additional neutral lipids, the bilayer deforms and a nascent LD buds into the cytoplasm. The nascent droplet might remain attached to the ER or separate completely. LD can growth by two general mechanisms: LD expansion or LD fusion (Wilfling *et al.*, 2014). The expansion is triggered by the relocalization of TG

synthesis enzymes from the ER to the surface of LD (Beller et al., 2010; Wilfling et al., 2014). When phosphatidylcholine is limited and the tension at the surface is relatively high, large LD can be formed by fusion/coalescence of two or more LD (Beller et al., 2010; Wilfling et al., 2014). During steatogenesis, the expression pattern of several LD associated proteins (proteins belonging to the perilipins family) changes. This is probably associated with the increased expression of PPAR γ , a transcription factor that targets several genes implicated in LD formation (Inoue et al., 2005; Matsusue et al., 2008). Notably, perilipin 1, only expressed in adipose tissue in normal condition is also expressed in fatty liver (Fujii et al., 2009; Straub et al., 2008). ADRP levels are also elevated in fatty liver (Motomura et al., 2006). High expression of hepatic lipase (Yamada et al., 2015) and lysophospholipase-like1 (Speliotes et al., 2011), two enzymes with TG lipase activity, as well as DGAT2, an enzyme involved in TG synthesis (Kantartzis et al., 2009), have been associated with the risk of developing hepatic steatosis. Interestingly, several studies showed that genetic variations of genes implicated in hepatic lipid accumulation and in LD such as ATGL and CGI58, are not associated with IR (Cohen et al., 2011; Hooper et al., 2011). This is consistent with the hypothesis that the sequestration of lipids into hepatic LD protects the liver from free fatty acid induced lipotoxicity that promotes IR.

A.2.5 Role of Lipogenesis in NAFLD

Numerous studies have implicated DNL in the development of NAFLD. DNL consists in the conversion of carbohydrates into lipids. These newly synthesized lipids are essentially esterified into TG and then either shipped via the very low density lipoproteins (VLDL) to the peripheral tissues including lipid-storing tissues like muscles and adipose tissues or accumulated in LD (Rui, 2014; Strable & Ntambi, 2010). The classical DNL pathway is widely documented and can be summarized as follow (Fig.A.2.3). In pro-lipogenic conditions, blood glucose is internalized and pyruvate is produced by the glycolysis. The pyruvate is converted into acetyl-CoA by the

ATPcitrate lyase (Ameer et al., 2014; Rui, 2014) and converted in malonyl-CoA by the acetyl-CoA carboxylase (ACC). The malonyl-CoA is in turn converted into palmitate (C16:0) by the fatty acid synthase (FAS) from the malonyl and acetyl-CoA (Lodhi et al., 2011; Rui, 2014; Strable & Ntambi, 2010). Subsequently, the palmitate can be modified by elongation, desaturation or esterification. Elongation is mainly catalyzed by the ELOVL6 enzyme (Strable & Ntambi, 2010). The substrates of ELOVL6 also include saturated and monounsaturated fatty acids from the DNL or from the diet (Kessler et al., 2014; Matsuzaka & Shimano, 2011; Moon et al., 2001). The stearoyl CoA desaturase 1 (SCD1) is responsible for the Δ -9 desaturation of fatty acids produced by DNL and coming from the diet generating the palmitoleate (C16:1n-9) and oleate (C18:1n-9). The monounsaturated fatty acids (MUFA) are then preferentially mobilized for the formation of phospholipids, cholesteryl esters and TG (Mauvoisin & Mounier, 2011; Strable & Ntambi, 2010). These syntheses occur in the ER involving GPAT (glycerol-3-phosphate acyltransferase), PAP (phosphatidic acid phosphohydrolase) and DGAT (diacylglycerol acyltransferase) (Coleman & Mashek, 2011; Nye et al., 2008). DNL is considered a great contributor to NAFLD and obesity progression. Patients with NAFLD present a 30 % increase in hepatic TG derived from DNL while 60 % came from the circulating FFA (NEFA) and less than 10 % came from diet (Donnelly et al., 2005; Matsuzaka & Shimano, 2011). Many studies have clearly associated the high levels of sugar consumption with activation of DNL and NAFLD development (Moore et al., 2014). Contribution of hepatic DNL to TG secretion was also significantly higher in NAFLD patients than in healthy patients while the inverse was shown for the contribution of NEFA re-esterification (Diraison et al., 2003). Lambert and collaborators recently demonstrated that subjects with high hepatic fat content present higher DNL than those with hepatic low fat content. However, this was only moderately correlated with the hepatic TG content (Lambert et al., 2014).

The DNL pathway is highly regulated in response to body needs. Nutrients and hormones are the major regulators of this pathway. The expressions of the key
lipogenic genes expression are mainly regulated at the transcriptional level by LXR (liver X receptor), RXR (retinoid X receptor), SREBP (Sterol regulatory element binding protein) and ChREBP (carbohydrate responsive element binding protein) transcription factors (Strable & Ntambi, 2010). Many studies based on "OMIC" approaches as well as studies using human subject or engineered animals revealed that more than the rate of hepatic DNL is the type of stored FA associated with NAFLD progression, suggesting the implication of the specific genes involved in the DNL pathway. Patients diagnosed with NAFLD have more hepatic endogenous C12:0 to C22:0 lipids (monounsaturated and polyunsaturated) than control patients. In NASH patients, the C18:0/C16:0 ratio is increased and strongly associated with steatosis. This suggests an important role for ELOVL6 in the progression of fatty liver diseases. In parallel, transcriptional expression levels of SCD-1, ELOVL6, SREBP-1C, FAS, and PPARy were markedly enhanced in NASH group compared to simple steatosis but less associated with the different histological manifestations scores of NAFLD (Yamada et al., 2015). Elov16 -/- mice are protected from atherogenic HFD-induced liver injuries, inflammation, oxidative stress, fibrosis and NASH progression, while transgenic mice overexpressing human ELOVL6 showed an opposite phenotype (Matsuzaka et al., 2012). In the same study, examination of NASH-human biopsy samples showed a correlation between ELOVL6 expression and liver injury. The authors suggest that ELOVL6 mediates its effect on NASH by promoting the palmitate-induced activation of the NLR family pyrin domain-containing 3 inflammasome. At the opposite, another Elovl6 -/- mice model accumulated significantly more hepatic TG than control mice under fat-free/high carbohydrate diet and HFD. In these conditions, the Elovl6 -/mice are not protected against obesity, fatty liver and IR (Moon et al., 2014). The authors also showed that abolishing Elovl6 expression in ob/ob mice does not change their phenotype. However, these mice produced more C18:1n7 than controls, suggesting the presence of an ELOVL6 alternative pathway to generate stearic acid. Therefore, the precise role for ELOVL6 in NAFLD and NASH development remains to be determined. Other lipogenic genes can predispose to NAFLD, namely ACC, FAS

and SCD-1 as well as the associated transcription factors SREBP-1c, LXR and ChREBP. Recently, a study showed that hepatic human biopsies obtained from patients with NAFLD showed a significant decreased expression of sirtuins (SIRT) proteins compared to control patients. This is associated with a higher expression of ACC, FAS and SREBP-1c (Wu et al., 2014). Interestingly it was previously demonstrated that SIRT proteins have an anti-NAFLD potential by reducing the expression of lipogenic genes (Yamazaki et al., 2009). Deletion of ACC1 in mice is lethal while ACC2 -/mice are leaner mice and resistant to HFD-induced obesity and IR. These mice present a lower level of hepatic mitochondrial malonyl-CoA leading to activation of CPT1 and subsequently to β –oxidation (Abu-Elheiga *et al.*, 2003; Postic & Girard, 2008b). In fact, NASH is characterized by an elevated concentration of malonyl-CoA probably due to an increased activity of ACC. In turn, malonyl-CoA inhibits the carnitine palmitoyltransferase-1 (CPT-1) leading to a decrease of long chain fatty acids import into the mitochondria, and consequently a reduction in β -oxidation. Consequently, TG accumulate in the liver aggravating the steatosis (Rolo et al., 2012; Vega et al., 2000). Liver specific ACC1 KO mice (LACC1 KO) do not present any health problem under normal diet. However, the decreased contents of hepatic malonyl-CoA and TG are associated with a lower lipogenic yield (twofold) (Mao et al., 2006a). Unexpectedly, these mice fed with HFD showed an up-regulation of both FAS and PPAR γ but this is still associated with a decrease in DNL and hepatic TG (Mao et al., 2006a). In another LACC1 KO mice model, Kohjima and collaborators showed that hepatic deletion of ACC1 activates both expression and activity of the ACC2. This compensatory phenomenon was associated with a null impact on DNL capacity compared to control animals. The authors conclude that silencing both isoforms of ACC is necessary to clearly establish a role for this enzyme in NAFLD (Postic & Girard, 2008b). Given its central role in the DNL process, FAS is an ideal target to prevent the NAFLD progression but also the progression of a large spectrum of other metabolic diseases such as obesity, diabetes, hepatocarcinoma, and cardiovascular complications (Berlanga et al., 2014a). Studies performed on human NAFLD biopsies (Kohjima et

al., 2007; Yamada *et al.*, 2015), on human primary hepatocytes exposed to palmitic acid as well as on murine models of steatohepatitis (Dorn *et al.*, 2010) revealed a marked elevation in FAS expression associated with NAFLD or NAFLD-like conditions. Unexpectedly, liver-specific FASKO mice developed fatty liver and hypoglycemia under a zero-fat diet and this was reversed by addition of dietary fat. A similar observation was made under fasting. This was corrected by addition of PPARa agonist suggesting that FAS is responsible for the synthesis of PPARa ligands (Chakravarthy *et al.*, 2005). Indeed, silencing FAS expression results in a decrease of de novo synthesized LCFA known to be the activating-ligands of PPARa (Chakravarthy *et al.*, 2005; Postic & Girard, 2008b). Therefore, through the activation of PPARa, FAS can induce β -oxidation decreasing TG accumulation in the liver. However, silencing FAS gene expression could also lead to accumulation of malonyl-CoA, inhibiting CPT1 activity and consequently decreasing β -oxidation. This latter pathway seems to be predominant as most of the published data confirms the relevance of modulating FAS expression to prevent NAFLD progression.

Several reports also demonstrated a marked elevation in hepatic LXR expression associated with NAFLD (Berlanga *et al.*, 2014a; Ducheix *et al.*, 2013; Higuchi *et al.*, 2008). Immunostaining of hepatic human biopsies revealed that the rate of positive LXR α expression was 30 % in healthy people, 50 % in NAFLD patients, and 97 % in NASH. LXR α expression was also positively associated with SREBP-1c expression as well as with inflammation, hepatic fibrosis progression and elevated expression of genes involved in fatty acid uptake (Ahn *et al.*, 2014). In agreement with this study, Higuchi and collaborators showed that in hepatic biopsies of NAFLD patients, overexpression of LXR is correlated with higher expression of SREBP-1c (Higuchi *et al.*, 2008). Treatment of diet-induced NAFLD mice with SR9238, a selective LXR α / β inhibitor, abrogated hepatic DNL, lowered inflammation progression and hepatic lipids accumulation. In these conditions, no hepatic damage was observed (Griffett *et al.*, 2013). In another study Sim and collaborators showed that treating mice fed with a HFD with the LXR α antagonist MDGA (meso-dihydroguaiaretic) decreases hepatic lipid accumulation. This is directly correlated with a marked drop in lipogenic genes expression (Sim et al., 2014). Silencing SREBP-1c in ob/ob mice in both liver and adipose tissues is associated with a mark reduction in fatty liver progression, while obesity and IR remained unchanged. This correlated with a reduction in hepatic TG content and a lower expression of lipogenic genes. This suggests an implication of SREBP-1c in fatty liver (and maybe in NAFLD) but not in obesity (Yahagi et al., 2002). However, the knockout in both liver and adipose tissue may influence the data and a specific hepatic knockout may clarify the implication of SREBP-1c in obesity and IR progression. Interestingly, it was recently showed that Dec1 (differentiated embryo chondrocyte expressed gene 1), a negative regulator of SREBP-1c expression, is under expressed in NAFLD while its overexpression led to a significant drop in SREBP-1c and other lipogenic genes such as FAS and ACC decreasing accumulation of hepatic TG (Shen *et al.*, 2014). Another study showed that comparing healthy, simple steatosis and NASH patients does not revealed any signifi cant difference in fatty acid uptake, hepatic lipid oxidation and VLDL secretion. However, NASH patients show a lower hepatic SREBP-1c and lipogenic genes expressions (Nagaya et al., 2010). This suggests that down-regulation of SREBP-1c and lipogenic enzymes are characteristics of a fibrosis state probably mediated by a higher level of $TNF\alpha$. Therefore, expressions of lipogenic enzymes must be specific for each step of the NAFLD progression spectrum. Recently, a potential role of SREBP-1a in NAFLD was also suggested as SREBP-1a knock-down induced a significant drop in SREBP-1c expression associated with a radical decrease in the expression level of all lipogenic genes (Bitter et al., 2015). While LXR α , SREBP-1c and lipogenic genes were upregulated in NAFLD diagnosed patients, ChREBP expression is not modify (Higuchi et al., 2008). However patients with NASH show higher ChREBP expression when steatosis was upper than 50 % and lowered if IR was present (Benhamed et al., 2012). In the same study, it was showed that mice fed with HFD showed elevated expression of ChREBP that can dissociate hepatic steatosis to the IR ameliorating lipid metabolism and glucose metabolism. However, liver-specific inhibition of ChREBP in ob/ob mice led to decrease plasma

TG and NEFA levels improving steatohepatitis. This is associated with elevated lipogenic rate and enhanced insulin sensitivity in liver, skeletal muscles and white adipose tissue (Dentin *et al.*, 2006). Taken together, the studies reveal that elevated DNL is associated with increased hepatic TG and NAFLD development. This is probably the result of increased SREBP-1c expression. However, the progression of the disease leading to NASH seems to be associated with a lower DNL probably through the activation of TNF α secretion inhibiting SREBP-1c. However, even if a general role of the DNL is established, a role of each individual enzyme remains to be precisely defined due to presence of compensatory mechanisms.

A.2.6 Role of Delta 5 (Δ 5) and Delta 6 (Δ 6) Desaturases in NAFLD

Livers of obese patients with NAFLD show depletion in the concentration of long chain poly-unsaturated fatty acids (LCPUFA) especially the n-3 and n-6 series of TG (Araya et al., 2010; Araya et al., 2004). In particular, a strong decrease of arachidonic acid (AA; 20:4, n-6), eicosapentaenoic acid (EPA; 20:5, n-3) and docosahexaenoic acid (DHA; 22:6, n3) was observed in hepatic steatosis and steatohepatitis (Araya et al., 2004). Depletion of such fatty acids may be responsible for the progression of the disease leading to cirrhosis (Gormaz et al., 2010). Modification in the availability of LCPUFA has also been associated with numerous other metabolic pathologies often associated with NAFLD such as cardio-vascular diseases, obesity, type II diabetes and metabolic syndrome (Gormaz et al., 2010). LCPUFA are formed by series of desaturations and elongations. Δ 5 and Δ 6 desaturases are the key desaturases in this process catalyzing the synthesis of n-3 and n-6 LCPUFA (Vessby et al., 2002). The 18:2(n-6) and 18:3(n-3) are desaturated by the Δ 6 desaturase to form the 18:3(n-6) and 18:4(n-3) while the Δ 5 desaturase will form the AA, EPA and DHA. In this process, the $\Delta 6$ desaturase is the rate-limiting enzyme (Lenihan-Geels *et al.*, 2013). If the role of SCD1 in the development of NASH has been clearly established, the roles of the Δ 5 and Δ 6 desaturases appear more complex. In a study published in 2005, Tovar and

collaborators showed that feeding hyperinsulinemic obese Zucker fa/fa rats with Soy protein decreases liver steatosis and lipotoxicity. This is associated with a potent inhibition of both Δ 5 and Δ 6 mRNA levels (40 % and 69% respectively) (Tovar *et al.*, 2005). However liver of mice fed with methionine and choline deficient diet (MCD), a nutritional model of steatohepatitis displays a significant increase in Δ 5 and Δ 6 desaturases mRNA (Larter et al., 2008). In these studies, the type of hepatic LCPUFA was not evaluated. Recently, a study performed in liver biopsies of NASH patients showed a clear increased in both Δ 5 and Δ 6 desaturases mRNA expression. This was associated with an impaired desaturation of $\omega 3$ and $\omega 6$ fatty acids, with an increase in the $\omega 6:\omega 3$ ratio and a reduction in the $\omega 3$ desaturation index (Lopez-Vicario *et al.*, 2014). Several other studies performed in obese NAFLD patients also revealed a decrease in Δ 5 and Δ 6 desaturases activities and an increase in the ω 6: ω 3 ratio (Araya et al., 2010; Araya et al., 2004; Kotronen et al., 2009). Interestingly, it was recently showed that the decrease in $\Delta 6$ desaturase expression is associated with an up regulation of miR-140, and miR2885, two miRNA previously associated with hepatic disorders and NAFLD (Fatima et al., 2014). The molecular mechanisms of LCPUFA depletion on NAFLD development can be explained by the effect of these fatty acids on the transcription factors involved in lipogenesis and β -oxidation (Pettinelli *et al.*, 2009). LCPUFA inhibits the expression of both ChREBP (Dentin et al., 2005) and SREBP-1c (Hannah et al., 2001), two transcription factors known to activate lipogenic genes expression in response to sugar and insulin respectively. At the opposite, LCPUFA activate PPAR α promoting β -oxidation (Nakamura & Nara, 2004). At the difference of the previous published reports, a study performed in 1100 non-obese elderly men showed that an increased in Δ 6 desaturase index is positively associated with the plasmatic concentration of alanine aminotransferase (ALT), a marker of liver injury. Even if in this study, the authors did not directly measured the presence of lipid in the liver, they observed a positive correlation between plasmatic fatty acid composition known to be associated with fat liver, and Δ 6 desaturase activity

(Petersson et al., 2010). The authors explained the differences between their

observations and those made by the other groups by the fact that their study was performed in non-obese elderly men (BMI: 26.3 ± 3.4) compared to the other studies performed with severely obese subject (BMI around 50) (Araya et al., 2010; Araya et al., 2004; Kotronen et al., 2009). According to the authors, the decrease in Δ 6 desaturase activity observed by the other studies may be a consequence of long term obesity and hyperinsulinemia. They also argue that the low number of patients in the other studies (10 in average vs. 1100 subjects in the present study) may also influence the results observed by other groups. Finally, the authors mentioned that their study was performed on Swedish patients while most of the other studies were performed on patients from Chile (Araya et al., 2010; Araya et al., 2004). According to them, the differences observed may be the result of different genetic background and dietary habits. However, a study performed with Finn patients that have probably similar life style habits than patients from Sweden, also showed a decrease in the $\omega 6:\omega 3$ ratio (Kotronen et al., 2009). Despite the differences observed in the latest described study, a consensus seems to emerge at least in obese patients, on an increase in the ω 6: ω 3 ratio associated with the development of NAFLD and the metabolic disorders. This prompts the researchers to propose a dietary $\omega 3$ supplementation to reduce the hepatic TG content and the associated liver injury (Capanni et al., 2006; Spadaro et al., 2008). However, a recently published trial performed on 103 obese patients treated with EPA and DHA for 15-18 months showed a decrease in fat liver content but no effect on liver fibrosis biomarker scores. At the opposite, a study performed in children shows that DHA supplementation improved liver steatosis and insulin sensitivity (Nobili et al., 2013) while lack of ω 3 consumption increase lobular inflammation (St-Jules *et al.*, 2013). Taken together, in obese patients with NAFLD, LCPUFA are depleted and the ω 6: ω 3 ratio elevated. This results in hepatic AA accumulation, activation of DNL and inhibition of β -oxidation. This increase in the ω 6: ω 3 ratio probably further aggravates the hepatic pathology increasing the inflammation and the fatty acid deposit. This could be ameliorates by ω 3 supplementation however the time and dose for the treatment may be adjusted. Difference in patients should also be taken in consideration.

A.2.7 Role of the Stearoyl CoA Desaturase 1 in NAFLD

Numerous studies have associated an elevated stearoyl-CoA desaturase 1 (SCD1) activity with the pathophysiology of fatty liver disease in both mice and humans. SCD1, also known as fatty acid desaturase or $\Delta 9$ -desaturase, is a microsomal enzyme involved in the biosynthesis of monounsaturated fatty acids (MUFA), primarily oleate (C18:1) and palmitoleate (C16:1). These MUFA are the major substrates for the synthesis of complex lipids such as DAG, phospholipids, TG, wax esters, and cholesterol esters (Mauvoisin & Mounier, 2011; Nakamura & Nara, 2004; Sampath & Ntambi, 2006). SCD1 is now considered as one of the major enzymes in the control of lipid metabolism (Flowers & Ntambi, 2008). Mice with naturally occurring SCD1 null mutations and those with global deletion (SCD1 -/-) display a hyper metabolic phenotype that protects the animal from obesity, IR and hepatic steatosis under high-carbohydrate diet or HFD (Flowers & Ntambi, 2008; Miyazaki et al., 2004; Miyazaki et al., 2001; Ntambi et al., 2002). The SCD1 -/- mice also display reduced hepatic TG and cholesterol esters. This is associated with upregulation of the carnitine palmitoyltransferase 1 (CPT1), the rate limiting enzyme of lipid β -oxydation while the genes encoding for the enzymes implicated in lipid synthesis (FAS and glycerol phosphate acyl-CoA transferase (GPAT)) are reduced (Ntambi et al., 2002). Liver specific SCD1 knockout mice (LKO mice) are also protected from carbohydrate but not from HFD-induced hepatic steatosis (Miyazaki et al., 2007). Elevated hepatic SCD1 expression appears therefore associated with carbohydrate-induced hepatic steatosis while an extra-hepatic expression seems necessary to promote HFD-induced steatosis. However, mice intraperitoneally injected with SCD1 targeted antisense oligonucleotide (ASO) are protected from development of NAFLD under HFD (Brown et al., 2008). The discrepancy between the two studies can be explained by the fact that ASO-injected mice showed inhibition of SCD1 expression both in liver and adipose tissue while in LKO mice SCD1 is only inhibited in liver (Flowers & Ntambi, 2008). In addition, LKO mice display reduced nuclear content of ChREBP and SREBP-1c, two key

transcription factors regulating the expression of lipogenic genes in response to glucose and insulin respectively. The exact mechanism by which SCD1 affects the maturation or the translocation of these two transcriptional factors remains to be identified. A possible explanation could be that decreased in oleate concentration in LKO mice is responsible for the inhibition of ChREBP and SREBP-1c expressions as oleate supplementation normalized their levels (Miyazaki et al., 2007). In human studies, the role of SCD1 in hepatic fat metabolism has been mainly evaluated by the measure of the both hepatic (Kotronen et al., 2009; Silbernagel et al., 2012) and plasmatic (Lee et al., 2015; Petersson et al., 2010; Stefan et al., 2008) 18:1 n-9/18:0 ratio referred as the desaturase index. The hepatic desaturase index in total lipids from individuals with or without NAFLD was found to be positively correlated with the percentage of hepatic fat (Kotronen et al., 2009). In this latter study, the authors state that fatty liver is characterized by an increase in hepatic SCD1 activity. In contrast to this data, another study showed that the desaturase index in VLDL-TG was negatively correlated with the hepatic fat content particularly in obese patients while no apparent correlation was observed in lean patients (Stefan et al., 2008). The authors suggested that the liver specific down regulation of SCD1 may impair VLDL assembly and subsequently may reduce the capacity for the liver to clear intra-hepatic TG. The authors stated that the differences between their observations and those made in mice could be explained by the fact that SCD1 -/- mice present a lean and not an obese phenotype. In addition, the desaturation index in VLDL-TG can reflect both hepatic and fat SCD1 desaturation indexes while most of the studies performed in mice have directly measured the hepatic SCD1 index. At the opposite, Peters and collaborators showed that in 50 non-obese Caucasians, the SCD1 index correlates with the hepatic TG content while no correlation was observed with the PL fraction. Interestingly, in the same study, the authors did not find any correlation with the hepatic SCD1 mRNA level showing the importance of measuring specific FA fraction to evaluate SCD1 activity (Peter et al., 2011). In another study also performed in non-obese healthy patients, the basal SCD1 activity index does not appeared to correlate with the hepatic fat content (Silbernagel

et al., 2012). The authors also showed that addition of a sugar-enriched lipogenic diet increases the hepatic fat content that is negatively correlated with the hepatic SCD1 activity (Silbernagel et al., 2012). The authors suggest that SCD1 may protect from the adverse effects of a lipogenic enriched sugar diet. Interestingly, the authors proposed the hypothesis that low hepatic SCD1 activity observed in sugar-enriched lipogenic diet, can be the consequence of long-chain saturated fatty acids accumulation such as palmitate, leading to ER stress (Cao et al., 2012). This in turn inhibits VLDL secretion leading to hepatic TG accumulation and steatosis (Caviglia et al., 2011). Adding to the complexity, a recent study showed that in obese patients, the 16:1 n-7/16:0 desaturation index correlates with the hepatic fat content but not with the 18:1 n-9/18:0 index (Lee et al., 2015). Finally, Li and collaborators investigated the role of hepatic SCD1 in the prevention of hepatic inflammation, apoptosis and fibrosis in a model of steatosis using both in vitro (murine and human hepatocytes) and in vivo models (Li et al., 2009). Their findings suggest that up-regulation of hepatic SCD1 is a crucial adaptive mechanism in the prevention of liver damage and hepatitis by decreasing the amount of SFA in hepatocytes. Taken together, all this evidences point for a central role of SCD1 in the pathogenesis of NAFLD. SCD1 activity is indeed necessary for the generation of hepatic TG, the main lipids stored in LD, generating the initial step of steatosis. However the association between the hepatic level of SCD1 activity and the TG content appears to depend on several conditions such as the presence or not of obesity (low or high FA flux), the site of SCD1 expression (liver vs. adipose tissue), the type of fatty acids examined (C16 vs. C18) and finally the type of diet used in the studies. At the opposite, a consensus emerged that high SCD1 activity may protect liver from lipotoxicity by decreasing the pool of hepatic SFA and increasing of the pool of MUFA.

A.2.8 Conclusion

NAFLD is characterized by the accumulation of TG in hepatic LD. The disease can

range from a simple steatosis to a NASH characterized by the apparition of hepatic injury, inflammation, and eventually fi brosis. To date evidences point for a central role of hepatic DNL in the establishment of NAFLD especially in the case of energy excess as observed in obesity. In these conditions, a large part of hepatic TG comes from DNL. This is associated with an elevated expression of the lipogenic enzymes and the associated transcription factor SREBP-1c. However, when the disease progress, $TNF\alpha$ concentration raises leading to increased inflammation. Consequently, TNF α downregulates SREBP-1c expression leading to transcriptional inhibition of the lipogenic genes. FAS is also responsible for the synthesis of LCFA. These fatty acids are the direct activators of PPAR α activating β -oxidation while high SCD1 activity decreases the pool of LCFA such as palmitate, a fatty acid inducing inflammation. Therefore, apparition of NASH associated with elevated TNF α will inhibit FAS and SCD1 activities aggravating the disease by decreasing β -oxidation and increasing palmitate concentration. Taken together, activation of DNL appears implicated in the establishment of NAFLD while DNL inhibition will be more associated with the progression of the disease and the apparition of NASH. Finally, the roles of $\Delta 5$ and $\Delta 6$ desaturases appear more controversial. However, a consensus seems to be established that in obese patients, the $\omega 6:\omega 3$ ratio raises associated with an elevated concentration of AA, a $\omega 6$ FA implicated in the development of inflammation. Consequently, the NAFLD progresses in NASH and eventually in cirrhosis.

In conclusion, treatment of NAFLD could be achieved by inhibition of DNL while for NASH, a decrease in the $\omega 6:\omega 3$ ratio could be a better target that can be achieved by $\omega 3$ supplementation.

A.2.10 Figure legends

Figure A.2.1: Schematic representation of pathological conditions spectrum characterizing the NAFLD progression. In comparison with a normal liver, four steps of the NAFLD progression are schematized here from simple fatty liver to hepatocarcinoma through NASH and non-alcoholic cirrhosis. The three histologic pictures from microscopic imaging are incorporated to compare normal hepatocytes with hepatocytes in fibrosis characterized by perivenular/pericellular step and with NASH hepatocytes presenting ballooned morphology (Kanuri & Bergheim, 2013). NASH non-alcoholic steatohepatitis, H&E hematoxylin-Eosin stain, MT Masson-trichrome stain.

Figure A.2.2: The lensing model of lipids droplets (LD) biogenesis. This schematic representation depicts the three steps of the "lensing" model, the most widely accepted model for LD biogenesis. (a) Newly synthesized FFA are acetylated by ACBP and esterified by DAG and TG synthesis enzymes. (b) LPA, PA, DAG and TG accumulate within the phospholipidic bilayer inducing a membrane lensing in the cytosolic surface of the ER. (c) Formation of a prolonged lensing induces a sufficient bilayer deformation allowing the nascent of LD. The LD can separate completely, fuse together or remain attached to the ER. Associated proteins such as PLIN ensure the stabilization of the LD (Guo *et al.*, 2009; Kohlwein *et al.*, 2013). DNL (*de novo* lipogenesis), FFA (free fatty acids), ACBP (acetyl-CoA binding protein), GPAT (glycerol-3-phosphate acyltransferase), AGPAT (1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase), PAP (phosphatidic acid phosphohydrolase), DGAT (diacylglycerol acyltransferase), LPA (lysophosphatidic acid), PA (phosphatidic acid), DAG (diacylglycerol), TG (triacylglycerol), PLIN (perilipin).

Figure A.2.3: *De novo* lipogenesis pathway. This schematic representation depicts the lipogenic process and its positive regulators from the glucose absorption to the fatty

acids and cholesterol esters production. Insulin and glucose are represented as the two main activators of the process. Insulin activates the PI3k/Akt/mTOR pathway leading to the cleavage of SREBP while glucose serves at a lipogenic precursor and an activator for ChREBP and LXR (Kersten, 2001; Strable & Ntambi, 2010).

Figure A.2.1











RÉFÉRENCES

BIBLIOGRAPHIE

- Abdallah Ismail, N., Ragab, S. H., Abd Elbaky, A., Shoeib, A. R., Alhosary, Y., & Fekry, D. (2011). Frequency of Firmicutes and Bacteroidetes in gut microbiota in obese and normal weight Egyptian children and adults. *Arch Med Sci*, 7(3), 501-507.
- Abe, S., Ezaki, O., & Suzuki, M. (2019). Medium-chain triglycerides (8:0 and 10:0) are promising nutrients for sarcopenia: a randomized controlled trial. *Am J Clin Nutr*, *110*(3), 652-665.
- Abu-Elheiga, L., Oh, W., Kordari, P., & Wakil, S. J. (2003). Acetyl-CoA carboxylase 2 mutant mice are protected against obesity and diabetes induced by highfat/high-carbohydrate diets. *Proceedings of the National Academy of Sciences* of the United States of America, 100(18), 10207-10212.
- Adams, M., Montague, C. T., Prins, J. B., Holder, J. C., Smith, S. A., Sanders, L., Digby, J. E., Sewter, C. P., Lazar, M. A., Chatterjee, V. K., & O'Rahilly, S. (1997). Activators of peroxisome proliferator-activated receptor gamma have depot-specific effects on human preadipocyte differentiation. J Clin Invest, 100(12), 3149-3153.
- Adeva-Andany, M. M., Carneiro-Freire, N., Seco-Filgueira, M., Fernandez-Fernandez, C., & Mourino-Bayolo, D. (2018). Mitochondrial beta-oxidation of saturated fatty acids in humans. *Mitochondrion*, In press.
- Adeva-Andany, M. M., Carneiro-Freire, N., Seco-Filgueira, M., Fernandez-Fernandez, C., & Mourino-Bayolo, D. (2019). Mitochondrial beta-oxidation of saturated fatty acids in humans. *Mitochondrion*, 46, 73-90.
- Ahmadian, M., Duncan, R. E., Jaworski, K., Sarkadi-Nagy, E., & Sul, H. S. (2007). Triacylglycerol metabolism in adipose tissue. *Future lipidology*, 2(2), 229-237.
- Ahmadian, M., Suh, J. M., Hah, N., Liddle, C., Atkins, A. R., Downes, M., & Evans, R. M. (2013). PPAR[gamma] signaling and metabolism: the good, the bad and the future. *Nat Med*, 99(5), 557-566.
- Ahn, S. B., Jang, K., Jun, D. W., Lee, B. H., & Shin, K. J. (2014). Expression of liver X receptor correlates with intrahepatic inflammation and fibrosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Dig Dis Sci*, 59(12), 2975-2982.

- Airhart, S., Cade, W. T., Jiang, H., Coggan, A. R., Racette, S. B., Korenblat, K., Spearie, C. A., Waller, S., O'Connor, R., Bashir, A., Ory, D. S., Schaffer, J. E., Novak, E., Farmer, M., Waggoner, A. D., Davila-Roman, V. G., Javidan-Nejad, C., & Peterson, L. R. (2016). A Diet Rich in Medium-Chain Fatty Acids Improves Systolic Function and Alters the Lipidomic Profile in Patients With Type 2 Diabetes: A Pilot Study. *J Clin Endocrinol Metab*, 101(2), 504-512.
- Akpa, M. M., Point, F., Sawadogo, S., Radenne, A., & Mounier, C. (2010). Inhibition of insulin and T3-induced fatty acid synthase by hexanoate. *Lipids*, 45(11), 997-1009.
- Akram, M. (2014). Citric acid cycle and role of its intermediates in metabolism. *Cell Biochem Biophys*, 68(3), 475-478.
- Al-Dayyat, H. a. M., Rayyan, Y. M., & Tayyem, R. F. (2018a). Non-alcoholic fatty liver disease and associated dietary and lifestyle risk factors. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*, 12(4), 569-575.
- Al-Dayyat, H. M., Rayyan, Y. M., & Tayyem, R. F. (2018b). Non-alcoholic fatty liver disease and associated dietary and lifestyle risk factors. *Diabetes Metab Syndr*, 12, 569-575.
- Alquier, T., Peyot, M. L., Latour, M. G., Kebede, M., Sorensen, C. M., Gesta, S., Ronald Kahn, C., Smith, R. D., Jetton, T. L., Metz, T. O., Prentki, M., & Poitout, V. (2009). Deletion of GPR40 impairs glucose-induced insulin secretion in vivo in mice without affecting intracellular fuel metabolism in islets. *Diabetes*, 58(11), 2607-2615.
- Aluko, R. (2012). Bioactive Lipids. In *Functional Foods and Nutraceuticals* (pp. 23-36).
- Amar, J., Burcelin, R., Ruidavets, J. B., Cani, P. D., Fauvel, J., Alessi, M. C., Chamontin, B., & Ferrieres, J. (2008). Energy intake is associated with endotoxemia in apparently healthy men. *Am J Clin Nutr*, 87(5), 1219-1223.
- Ambati, S., Li, Q., Rayalam, S., Hartzell, D. L., Della-Fera, M. A., Hamrick, M. W., & Baile, C. A. (2010). Central leptin versus ghrelin: effects on bone marrow adiposity and gene expression. *Endocrine*, 37(1), 115-123.
- Ameer, F., Scandiuzzi, L., Hasnain, S., Kalbacher, H., & Zaidi, N. (2014). De novo lipogenesis in health and disease. *Metabolism*, 63(7), 895-902.

- Amengual, J., Petrov, P., Bonet, M. L., Ribot, J., & Palou, A. (2012). Induction of carnitine palmitoyl transferase 1 and fatty acid oxidation by retinoic acid in HepG2 cells. *Int J Biochem Cell Biol*, 44(11), 2019-2027.
- Angulo, P. (2002). Nonalcoholic fatty liver disease. N Engl J Med, 346(16), 1221-1231.
- Aparicio-Vergara, M., Tencerova, M., Morgantini, C., Barreby, E., & Aouadi, M. (2017). Isolation of Kupffer Cells and Hepatocytes from a Single Mouse Liver. *Methods Mol Biol*, 1639, 161-171.
- Araya, J., Rodrigo, R., Pettinelli, P., Araya, A. V., Poniachik, J., & Videla, L. A. (2010). Decreased liver fatty acid delta-6 and delta-5 desaturase activity in obese patients. *Obesity (Silver Spring), 18*(7), 1460-1463.
- Araya, J., Rodrigo, R., Videla, L. A., Thielemann, L., Orellana, M., Pettinelli, P., & Poniachik, J. (2004). Increase in long-chain polyunsaturated fatty acid n - 6/n -3 ratio in relation to hepatic steatosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Clin Sci (Lond)*, 106(6), 635-643.
- Arias, E., & Cuervo, A. M. (2011). Chaperone-mediated autophagy in protein quality control. *Current Opinion in Cell Biology*, 23(2), 184-189.
- Arinell, K., Sahdo, B., Evans, A. L., Arnemo, J. M., Baandrup, U., & Frobert, O. (2012). Brown bears (Ursus arctos) seem resistant to atherosclerosis despite highly elevated plasma lipids during hibernation and active state. *Clin Transl Sci*, 5(3), 269-272.
- Arslan, N. (2014). Obesity, fatty liver disease and intestinal microbiota. *World Journal* of Gastroenterology : WJG, 20(44), 16452-16463.
- Assuncao, M. L., Ferreira, H. S., dos Santos, A. F., Cabral, C. R., Jr., & Florencio, T. M. (2009). Effects of dietary coconut oil on the biochemical and anthropometric profiles of women presenting abdominal obesity. *Lipids*, 44(7), 593-601.
- Athenstaedt, K., & Daum, G. (2006). The life cycle of neutral lipids: synthesis, storage and degradation. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 63(12), 1355-1369.
- Baba, N., Bracco, E. F., & Hashim, S. A. (1987). Role of brown adipose tissue in thermogenesis induced by overfeeding a diet containing medium chain triglyceride. *Lipids*, 22(6), 442-444.
- Babayan, V. K. (1987). Medium chain triglycerides and structured lipids. *Lipids*, 22(6), 417-420.

- Bach, A. C., & Babayan, V. K. (1982). Medium-chain triglycerides: an update. *Am J Clin Nutr*, 36(5), 950-962.
- Backhed, F., Manchester, J. K., Semenkovich, C. F., & Gordon, J. I. (2007). Mechanisms underlying the resistance to diet-induced obesity in germ-free mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(3), 979-984.
- Baenke, F., Peck, B., Miess, H., & Schulze, A. (2013). Hooked on fat: the role of lipid synthesis in cancer metabolism and tumour development. *Disease Models & Mechanisms*, 6(6), 1353-1363.
- Baggio, L. L., Huang, Q., Brown, T. J., & Drucker, D. J. (2004). A recombinant human glucagon-like peptide (GLP)-1-albumin protein (albugon) mimics peptidergic activation of GLP-1 receptor-dependent pathways coupled with satiety, gastrointestinal motility, and glucose homeostasis. *Diabetes*, 53(9), 2492-2500.
- Barbatelli, G., Murano, I., Madsen, L., Hao, Q., Jimenez, M., Kristiansen, K., Giacobino, J. P., Matteis, R. D., & Cinti, S. (2010). The emergence of coldinduced brown adipocytes in mouse white fat depots is determined predominantly by white to brown adipocyte transdifferentiation. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism, 298*(6), E1244-E1253.
- Barnett, C. R., & Barnett, Y. A. (2003). KETONE BODIES. In B. Caballero (Ed.), *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition (Second Edition)* (pp. 3421-3425). Oxford: Academic Press.
- Barreyro, F. J., Kobayashi, S., Bronk, S. F., Werneburg, N. W., Malhi, H., & Gores, G. J. (2007). Transcriptional regulation of Bim by FoxO3A mediates hepatocyte lipoapoptosis. *J Biol Chem*, 282(37), 27141-27154.
- Bartlett, K., & Eaton, S. (2004). Mitochondrial beta-oxidation. *Eur J Biochem*, 271(3), 462-469.
- Bastie, C. C., Nahle, Z., McLoughlin, T., Esser, K., Zhang, W., Unterman, T., & Abumrad, N. A. (2005). FoxO1 stimulates fatty acid uptake and oxidation in muscle cells through CD36-dependent and -independent mechanisms. *J Biol Chem, 280*(14), 14222-14229.
- Beck, V., Jaburek, M., Demina, T., Rupprecht, A., Porter, R. K., Jezek, P., & Pohl, E.
 E. (2007). Polyunsaturated fatty acids activate human uncoupling proteins 1 and 2 in planar lipid bilayers. *Faseb j, 21*(4), 1137-1144.

- Beiroa, D., Imbernon, M., Gallego, R., Senra, A., Herranz, D., Villarroya, F., Serrano, M., Ferno, J., Salvador, J., Escalada, J., Dieguez, C., Lopez, M., Fruhbeck, G., & Nogueiras, R. (2014). GLP-1 agonism stimulates brown adipose tissue thermogenesis and browning through hypothalamic AMPK. *Diabetes*, 63(10), 3346-3358.
- Beller, M., Bulankina, A. V., Hsiao, H. H., Urlaub, H., Jackle, H., & Kuhnlein, R. P. (2010). PERILIPIN-dependent control of lipid droplet structure and fat storage in Drosophila. *Cell Metab*, 12(5), 521-532.
- Bender, D. A. (2014). *Introduction to Nutrition and Metabolism, Fifth Edition* (Fifth edition ed.).
- Benhamed, F., Denechaud, P. D., Lemoine, M., Robichon, C., Moldes, M., Bertrand-Michel, J., Ratziu, V., Serfaty, L., Housset, C., Capeau, J., Girard, J., Guillou, H., & Postic, C. (2012). The lipogenic transcription factor ChREBP dissociates hepatic steatosis from insulin resistance in mice and humans. J Clin Invest, 122(6), 2176-2194.
- Berezina, A., Belyaeva, O., Berkovich, O., Baranova, E., Karonova, T., Bazhenova, E., Brovin, D., Grineva, E., & Shlyakhto, E. (2015). Prevalence, Risk Factors, and Genetic Traits in Metabolically Healthy and Unhealthy Obese Individuals. *Biomed Res Int, 2015*, 548734.
- Berg JM, T. J., Stryer L. (2002). The Utilization of Fatty Acids as Fuel Requires Three Stages of Processing. In t. e. N. Y. W. H. Freeman (Ed.), *Biochemistry*.
- Berlanga, A., Guiu-Jurado, E., Porras, J. A., & Auguet, T. (2014a). Molecular pathways in non-alcoholic fatty liver disease. *Clin Exp Gastroenterol*, *7*, 221-239.
- Berlanga, A., Guiu-Jurado, E., Porras, J. A., & Auguet, T. (2014b). Molecular pathways in non-alcoholic fatty liver disease. *Clinical and experimental gastroenterology*, 7, 221-239.
- Betz, M. J., & Enerback, S. (2015). Human Brown Adipose Tissue: What We Have Learned So Far. *Diabetes*, 64(7), 2352-2360.
- Binnert, C., Pachiaudi, C., Beylot, M., Hans, D., Vandermander, J., Chantre, P., Riou, J. P., & Laville, M. (1998). Influence of human obesity on the metabolic fate of dietary long- and medium-chain triacylglycerols. *Am J Clin Nutr*, 67(4), 595-601.
- Bitter, A., Nussler, A. K., Thasler, W. E., Klein, K., Zanger, U. M., Schwab, M., & Burk, O. (2015). Human sterol regulatory element-binding protein 1a

contributes significantly to hepatic lipogenic gene expression. *Cell Physiol Biochem*, 35(2), 803-815.

- Bjørndal, B., Burri, L., Staalesen, V., Skorve, J., & Berge, R. K. (2011). Different adipose depots: their role in the development of metabolic syndrome and mitochondrial response to hypolipidemic agents. *Journal of obesity*, 2011, 490650-490650.
- Blaut, M. (2015). Gut microbiota and energy balance: role in obesity. *Proc Nutr Soc*, 74(3), 227-234.
- Blaut, M., & Klaus, S. (2012). Intestinal microbiota and obesity. *Handb Exp Pharmacol*(209), 251-273.
- Boden, G., Song, W., Duan, X., Cheung, P., Kresge, K., Barrero, C., & Merali, S. (2011). Infusion of glucose and lipids at physiological rates causes acute endoplasmic reticulum stress in rat liver. *Obesity (Silver Spring)*, 19(7), 1366-1373.
- Bostrom, P., Wu, J., Jedrychowski, M. P., Korde, A., Ye, L., Lo, J. C., Rasbach, K. A., Bostrom, E. A., Choi, J. H., Long, J. Z., Kajimura, S., Zingaretti, M. C., Vind, B. F., Tu, H., Cinti, S., Hojlund, K., Gygi, S. P., & Spiegelman, B. M. (2012). A PGC1-alpha-dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis. *Nature*, 481(7382), 463-468.
- Boucher, J., Kleinridders, A., & Kahn, C. R. (2014). Insulin receptor signaling in normal and insulin-resistant states. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 6(1), a009191.
- Bourque, C., St-Onge, M. P., Papamandjaris, A. A., Cohn, J. S., & Jones, P. J. (2003). Consumption of an oil composed of medium chain triacyglycerols, phytosterols, and N-3 fatty acids improves cardiovascular risk profile in overweight women. *Metabolism*, 52(6), 771-777.
- 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.
- Brasaemle, D. L., & Wolins, N. E. (2012). Packaging of fat: an evolving model of lipid droplet assembly and expansion. *J Biol Chem*, 287(4), 2273-2279.
- Brockman, R. P. (1976). Effects of glucagon and insulin on lipolysis and ketogenesis in sheep. *Canadian journal of comparative medicine : Revue canadienne de medecine comparee, 40*(2), 166-170.

- Brondani, L. A., Assmann, T. S., Duarte, G. C., Gross, J. L., Canani, L. H., & Crispim, D. (2012). The role of the uncoupling protein 1 (UCP1) on the development of obesity and type 2 diabetes mellitus. *Arq Bras Endocrinol Metabol*, 56(4), 215-225.
- Brown, J. M., Chung, S., Sawyer, J. K., Degirolamo, C., Alger, H. M., Nguyen, T., Zhu, X., Duong, M. N., Wibley, A. L., Shah, R., Davis, M. A., Kelley, K., Wilson, M. D., Kent, C., Parks, J. S., & Rudel, L. L. (2008). Inhibition of stearoyl-coenzyme A desaturase 1 dissociates insulin resistance and obesity from atherosclerosis. *Circulation*, 118(14), 1467-1475.
- Brown, M. S., & Goldstein, J. L. (2008). Selective versus total insulin resistance: a pathogenic paradox. *Cell Metab*, 7(2), 95-96.
- Buhman, K. K., Chen, H. C., & Farese, R. V., Jr. (2001). The enzymes of neutral lipid synthesis. *J Biol Chem*, 276(44), 40369-40372.
- Burmeister, M. A., Ayala, J. E., Smouse, H., Landivar-Rocha, A., Brown, J. D., Drucker, D. J., Stoffers, D. A., Sandoval, D. A., Seeley, R. J., & Ayala, J. E. (2017). The Hypothalamic Glucagon-Like Peptide 1 Receptor Is Sufficient but Not Necessary for the Regulation of Energy Balance and Glucose Homeostasis in Mice. *Diabetes*, 66(2), 372-384.
- Buteau, J., Spatz, M. L., & Accili, D. (2006). Transcription factor FoxO1 mediates glucagon-like peptide-1 effects on pancreatic beta-cell mass. *Diabetes*, 55(5), 1190-1196.
- Buzzetti, E., Pinzani, M., & Tsochatzis, E. A. (2016). The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Metabolism*, 65(8), 1038-1048.
- Byrne, C. D. (2013). Ectopic fat, insulin resistance and non-alcoholic fatty liver disease. *Proc Nutr Soc*, 72(4), 412-419.
- Cadenas, S. (2018). Mitochondrial uncoupling, ROS generation and cardioprotection. *Biochim Biophys Acta Bioenerg*, 1859(9), 940-950.
- Calderon-Dominguez, M., Mir, J. F., Fucho, R., Weber, M., Serra, D., & Herrero, L. (2015). Fatty acid metabolism and the basis of brown adipose tissue function. *Adipocyte*, *5*(2), 98-118.
- Calderon-Dominguez, M., Mir, J. F., Fucho, R., Weber, M., Serra, D., & Herrero, L. (2016). Fatty acid metabolism and the basis of brown adipose tissue function. *Adipocyte*, 5(2), 98-118.

- Camps, L., Reina, M., Llobera, M., Bengtsson-Olivecrona, G., Olivecrona, T., & Vilaro, S. (1991). Lipoprotein lipase in lungs, spleen, and liver: synthesis and distribution. *Journal of lipid research*, 32(12), 1877-1888.
- Cani, P. D. (2012). Crosstalk between the gut microbiota and the endocannabinoid system: impact on the gut barrier function and the adipose tissue. *Clin Microbiol Infect, 18 Suppl 4*, 50-53.
- Cani, P. D., Amar, J., Iglesias, M. A., Poggi, M., Knauf, C., Bastelica, D., Neyrinck, A. M., Fava, F., Tuohy, K. M., Chabo, C., Waget, A., Delmee, E., Cousin, B., Sulpice, T., Chamontin, B., Ferrieres, J., Tanti, J. F., Gibson, G. R., Casteilla, L., Delzenne, N. M., Alessi, M. C., & Burcelin, R. (2007). Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes*, 56(7), 1761-1772.
- Cani, P. D., Bibiloni, R., Knauf, C., Waget, A., Neyrinck, A. M., Delzenne, N. M., & Burcelin, R. (2008). Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemiainduced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice. *Diabetes*, 57(6), 1470-1481.
- Cani, P. D., & Everard, A. (2016). Talking microbes: When gut bacteria interact with diet and host organs. *Mol Nutr Food Res, 60*(1), 58-66.
- Cani, P. D., Possemiers, S., Van de Wiele, T., Guiot, Y., Everard, A., Rottier, O., Geurts, L., Naslain, D., Neyrinck, A., Lambert, D. M., Muccioli, G. G., & Delzenne, N. M. (2009). Changes in gut microbiota control inflammation in obese mice through a mechanism involving GLP-2-driven improvement of gut permeability. *Gut*, 58(8), 1091-1103.
- Cao, J., Dai, D. L., Yao, L., Yu, H. H., Ning, B., Zhang, Q., Chen, J., Cheng, W. H., Shen, W., & Yang, Z. X. (2012). Saturated fatty acid induction of endoplasmic reticulum stress and apoptosis in human liver cells via the PERK/ATF4/CHOP signaling pathway. *Mol Cell Biochem*, 364(1-2), 115-129.
- Cao, Q., Jing, J., Cui, X., Shi, H., Xue, B., & . (2019). Sympathetic nerve innervation is required for beigeing in white fat. *Physiological Reports*, 7(6), e14031.
- Capanni, M., Calella, F., Biagini, M. R., Genise, S., Raimondi, L., Bedogni, G., Svegliati-Baroni, G., Sofi, F., Milani, S., Abbate, R., Surrenti, C., & Casini, A. (2006). Prolonged n-3 polyunsaturated fatty acid supplementation ameliorates hepatic steatosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease: a pilot study. *Aliment Pharmacol Ther*, 23(8), 1143-1151.

- Capeau, J. (2003). [Insulin signaling: mechanisms altered in insulin resistance]. *Med Sci (Paris)*, *19*(8-9), 834-839.
- Cardoso, D. A., Moreira, A. S., de Oliveira, G. M., Raggio Luiz, R., & Rosa, G. (2015). A Coconut Extra Virgin Oil-Rich Diet Increases Hdl Cholesterol and Decreases Waist Circumference and Body Mass in Coronary Artery Disease Patients. *Nutr Hosp*, 32(5), 2144-2152.
- Carlson, C. A., & Kim, K. H. (1973). Regulation of hepatic acetyl coenzyme A carboxylase by phosphorylation and dephosphorylation. *J Biol Chem*, 248(1), 378-380.
- Carneiro, I. P., Elliott, S. A., Siervo, M., Padwal, R., Bertoli, S., Battezzati, A., & Prado, C. M. (2016). Is Obesity Associated with Altered Energy Expenditure? *Advances in nutrition (Bethesda, Md.)*, 7(3), 476-487.
- Carpenter, K., Pollitt, R. J., & Middleton, B. (1992). Human liver long-chain 3hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase is a multifunctional membranebound beta-oxidation enzyme of mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun*, 183(2), 443-448.
- Caviglia, J. M., Gayet, C., Ota, T., Hernandez-Ono, A., Conlon, D. M., Jiang, H., Fisher, E. A., & Ginsberg, H. N. (2011). Different fatty acids inhibit apoB100 secretion by different pathways: unique roles for ER stress, ceramide, and autophagy. *Journal of lipid research*, 52(9), 1636-1651.
- Cazer, C. L., Volkova, V. V., & Grohn, Y. T. (2014). Use of pharmacokinetic modeling to assess antimicrobial pressure on enteric bacteria of beef cattle fed chlortetracycline for growth promotion, disease control, or treatment. *Foodborne Pathog Dis, 11*(5), 403-411.
- Cederbaum, A. I. (2015). Molecular mechanisms of the microsomal mixed function oxidases and biological and pathological implications. *Redox biology*, *4*, 60-73.
- Chadt, A., Scherneck, S., Joost, H.-G., & Al-Hasani, H. (2000). *Molecular links* between Obesity and Diabetes: "Diabesity": MDText.com, Inc., South Dartmouth (MA).
- Chakrabarti, P., Kim, J. Y., Singh, M., Shin, Y.-K., Kim, J., Kumbrink, J., Wu, Y., Lee, M.-J., Kirsch, K. H., Fried, S. K., & Kandror, K. V. (2013). Insulin inhibits lipolysis in adipocytes via the evolutionarily conserved mTORC1-Egr1-ATGLmediated pathway. *Molecular and cellular biology*, 33(18), 3659-3666.

- Chakravarthy, M. V., Pan, Z., Zhu, Y., Tordjman, K., Schneider, J. G., Coleman, T., Turk, J., & Semenkovich, C. F. (2005). "New" hepatic fat activates PPARalpha to maintain glucose, lipid, and cholesterol homeostasis. *Cell Metab*, 1(5), 309-322.
- Chamma, C. M., Bargut, T. C., Mandarim-de-Lacerda, C. A., & Aguila, M. B. (2017). A rich medium-chain triacylglycerol diet benefits adiposity but has adverse effects on the markers of hepatic lipogenesis and beta-oxidation. *Food Funct*, 8(2), 778-787.
- Charlton-Menys, V., & Durrington, P. N. (2008). Human cholesterol metabolism and therapeutic molecules. *Experimental Physiology*, 93(1), 27-42.
- Chavez, J. A., & Summers, S. A. (2012). A ceramide-centric view of insulin resistance. *Cell Metab*, 15(5), 585-594.
- Chen, J. C., Zhang, X., Singleton, T. P., & Kiechle, F. L. (2004). Mitochondrial membrane potential change induced by Hoechst 33342 in myelogenous leukemia cell line HL-60. *Ann Clin Lab Sci*, *34*(4), 458-466.
- Chen, X., Li, L., Liu, X., Luo, R., Liao, G., Li, L., Liu, J., Cheng, J., Lu, Y., & Chen, Y. (2018). Oleic acid protects saturated fatty acid mediated lipotoxicity in hepatocytes and rat of non-alcoholic steatohepatitis. *Life Sci*, 203, 291-304.
- Chene, G., Dubourdeau, M., Balard, P., Escoubet-Lozach, L., Orfila, C., Berry, A., Bernad, J., Aries, M. F., Charveron, M., & Pipy, B. (2007). n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids induce the expression of COX-2 via PPARgamma activation in human keratinocyte HaCaT cells. *Biochimica et biophysica acta*, 1771(5), 576-589.
- Chevrier, J., Dewailly, E., Ayotte, P., Mauriege, P., Despres, J. P., & Tremblay, A. (2000). Body weight loss increases plasma and adipose tissue concentrations of potentially toxic pollutants in obese individuals. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 24(10), 1272-1278.
- Cho, Y., & Shore, S. A. (2016). Obesity, Asthma, and the Microbiome. *Physiology* (*Bethesda*), 31(2), 108-116.
- Choi, C. S., Savage, D. B., Kulkarni, A., Yu, X. X., Liu, Z. X., Morino, K., Kim, S., Distefano, A., Samuel, V. T., Neschen, S., Zhang, D., Wang, A., Zhang, X. M., Kahn, M., Cline, G. W., Pandey, S. K., Geisler, J. G., Bhanot, S., Monia, B. P., & Shulman, G. I. (2007). Suppression of diacylglycerol acyltransferase-2 (DGAT2), but not DGAT1, with antisense oligonucleotides reverses diet-

induced hepatic steatosis and insulin resistance. *J Biol Chem*, 282(31), 22678-22688.

- Choi, Y.-J., Lee, K.-Y., Jung, S.-H., Kim, H. S., Shim, G., Kim, M.-G., Oh, Y.-K., Oh, S.-H., Jun, D. W., & Lee, B.-H. (2017). Activation of AMPK by berberine induces hepatic lipid accumulation by upregulation of fatty acid translocase CD36 in mice. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 316, 74-82.
- Choudhury, S. M., Tan, T. M., & Bloom, S. R. (2016). Gastrointestinal hormones and their role in obesity. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*, 23(1), 18-22.
- Chow, J., Lee, S. M., Shen, Y., Khosravi, A., & Mazmanian, S. K. (2010). Hostbacterial symbiosis in health and disease. *Adv Immunol*, 107, 243-274.
- Chretien, D., Benit, P., Ha, H. H., Keipert, S., El-Khoury, R., Chang, Y. T., Jastroch, M., Jacobs, H. T., Rustin, P., & Rak, M. (2018). Mitochondria are physiologically maintained at close to 50 degrees C. *PLoS Biol*, 16(1), e2003992.
- Clarke, S. F., Murphy, E. F., Nilaweera, K., Ross, P. R., Shanahan, F., O'Toole, P. W., & Cotter, P. D. (2012). The gut microbiota and its relationship to diet and obesity: new insights. *Gut Microbes*, 3(3), 186-202.
- Cohen, J. C., Horton, J. D., & Hobbs, H. H. (2011). Human fatty liver disease: old questions and new insights. *Science*, 332(6037), 1519-1523.
- Coleman, R. A., & Mashek, D. G. (2011). Mammalian triacylglycerol metabolism: synthesis, lipolysis, and signaling. *Chem Rev, 111*(10), 6359-6386.
- Corton, J. M., Gillespie, J. G., Hawley, S. A., & Hardie, D. G. (1995). 5aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside. A specific method for activating AMP-activated protein kinase in intact cells? *Eur J Biochem*, 229(2), 558-565.
- Crespo, J., Cayon, A., Fernandez-Gil, P., Hernandez-Guerra, M., Mayorga, M., Dominguez-Diez, A., Fernandez-Escalante, J. C., & Pons-Romero, F. (2001). Gene expression of tumor necrosis factor alpha and TNF-receptors, p55 and p75, in nonalcoholic steatohepatitis patients. *Hepatology*, 34(6), 1158-1163.
- Cui, X.-B., & Chen, S.-Y. (2016a). White adipose tissue browning and obesity. *Journal* of biomedical research, 31(1), 1-2.
- Cui, X. B., & Chen, S. Y. (2016b). White adipose tissue browning and obesity. *Journal* of biomedical research, 31(1), 1-2.

- Cui, Z., Truesdale, K. P., Bradshaw, P. T., Cai, J., & Stevens, J. (2015). Three-year weight change and cardiometabolic risk factors in obese and normal weight adults who are metabolically healthy: the atherosclerosis risk in communities study. *International journal of obesity (2005), 39*(8), 1203-1208.
- da Silva, M. D., Bobinski, F., Sato, K. L., Kolker, S. J., Sluka, K. A., & Santos, A. R. (2015). IL-10 cytokine released from M2 macrophages is crucial for analgesic and anti-inflammatory effects of acupuncture in a model of inflammatory muscle pain. *Mol Neurobiol*, 51(1), 19-31.
- Dalen, K. T., Dahl, T., Holter, E., Arntsen, B., Londos, C., Sztalryd, C., & Nebb, H. I. (2007). LSDP5 is a PAT protein specifically expressed in fatty acid oxidizing tissues. *Biochimica et biophysica acta*, 1771(2), 210-227.
- Dalzill, C., Nigam, A., Juneau, M., Guilbeault, V., Latour, E., Mauriege, P., & Gayda, M. (2014). Intensive lifestyle intervention improves cardiometabolic and exercise parameters in metabolically healthy obese and metabolically unhealthy obese individuals. *Can J Cardiol*, 30(4), 434-440.
- Daskalopoulou, S. S., Cooke, A. B., Gomez, Y. H., Mutter, A. F., Filippaios, A., Mesfum, E. T., & Mantzoros, C. S. (2014). Plasma irisin levels progressively increase in response to increasing exercise workloads in young, healthy, active subjects. *Eur J Endocrinol*, 171(3), 343-352.
- Daval, M., Diot-Dupuy, F., Bazin, R., Hainault, I., Viollet, B., Vaulont, S., Hajduch, E., Ferre, P., & Foufelle, F. (2005). Anti-lipolytic action of AMP-activated protein kinase in rodent adipocytes. *J Biol Chem*, 280(26), 25250-25257.
- Davies, S. P., Sim, A. T., & Hardie, D. G. (1990). Location and function of three sites phosphorylated on rat acetyl-CoA carboxylase by the AMP-activated protein kinase. *Eur J Biochem*, 187(1), 183-190.
- Day, C. P., & James, O. F. (1998). Steatohepatitis: a tale of two "hits"? *Gastroenterology*, 114(4), 842-845.
- De Vogel-van den Bosch, J., van den Berg, S. A., Bijland, S., Voshol, P. J., Havekes, L. M., Romijn, H. A., Hoeks, J., van Beurden, D., Hesselink, M. K., Schrauwen, P., & van Dijk, K. W. (2011). High-fat diets rich in medium- versus long-chain fatty acids induce distinct patterns of tissue specific insulin resistance. J Nutr Biochem, 22(4), 366-371.
- Deacon, C. F., Nauck, M. A., Meier, J., Hucking, K., & Holst, J. J. (2000). Degradation of endogenous and exogenous gastric inhibitory polypeptide in healthy and in

type 2 diabetic subjects as revealed using a new assay for the intact peptide. J Clin Endocrinol Metab, 85(10), 3575-3581.

- Décarie-Spain, L., Sharma, S., Hryhorczuk, C., Issa-Garcia, V., Barker, P. A., Arbour, N., Alquier, T., & Fulton, S. (2018). Nucleus accumbens inflammation mediates anxiodepressive behavior and compulsive sucrose seeking elicited by saturated dietary fat. *Molecular Metabolism*, 10, 1-13.
- Decuypere, J. A., & Dierick, N. A. (2003). The combined use of triacylglycerols containing medium-chain fatty acids and exogenous lipolytic enzymes as an alternative to in-feed antibiotics in piglets: concept, possibilities and limitations. An overview. *Nutr Res Rev, 16*(2), 193-210.
- Deffense, E. (1997). Trends in Food Science & Technology, 8(5), 178.
- DeGruttola, A. K., Low, D., Mizoguchi, A., & Mizoguchi, E. (2016). Current Understanding of Dysbiosis in Disease in Human and Animal Models. *Inflammatory bowel diseases, 22*(5), 1137-1150.
- Delzenne, N. M., & Cani, P. D. (2011). Interaction between obesity and the gut microbiota: relevance in nutrition. *Annual review of nutrition*, 31, 15-31.
- Delzenne, N. M., Neyrinck, A. M., Backhed, F., & Cani, P. D. (2011a). Targeting gut microbiota in obesity: effects of prebiotics and probiotics. *Nat Rev Endocrinol*, 7(11), 639-646.
- Delzenne, N. M., Neyrinck, A. M., & Cani, P. D. (2011b). Modulation of the gut microbiota by nutrients with prebiotic properties: consequences for host health in the context of obesity and metabolic syndrome. *Microb Cell Fact, 10 Suppl* 1, S10.
- den Besten, G., Lange, K., Havinga, R., van Dijk, T. H., Gerding, A., van Eunen, K., Muller, M., Groen, A. K., Hooiveld, G. J., Bakker, B. M., & Reijngoud, D. J. (2013a). Gut-derived short-chain fatty acids are vividly assimilated into host carbohydrates and lipids. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 305(12), G900-910.
- den Besten, G., van Eunen, K., Groen, A. K., Venema, K., Reijngoud, D. J., & Bakker, B. M. (2013b). The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism. *Journal of lipid research*, 54(9), 2325-2340.

- Dentin, R., Benhamed, F., Hainault, I., Fauveau, V., Foufelle, F., Dyck, J. R., Girard, J., & Postic, C. (2006). Liver-specific inhibition of ChREBP improves hepatic steatosis and insulin resistance in ob/ob mice. *Diabetes*, 55(8), 2159-2170.
- Dentin, R., Benhamed, F., Pegorier, J. P., Foufelle, F., Viollet, B., Vaulont, S., Girard, J., & Postic, C. (2005). Polyunsaturated fatty acids suppress glycolytic and lipogenic genes through the inhibition of ChREBP nuclear protein translocation. *J Clin Invest*, 115(10), 2843-2854.
- Dentin, R., Tomas-Cobos, L., Foufelle, F., Leopold, J., Girard, J., Postic, C., & Ferre, P. (2012). Glucose 6-phosphate, rather than xylulose 5-phosphate, is required for the activation of ChREBP in response to glucose in the liver. *J Hepatol*, *56*(1), 199-209.
- Desmarais, F., Bergeron, K. F., Lacaille, M., Lemieux, I., Bergeron, J., Biron, S., Rassart, E., Joanisse, D. R., Mauriege, P., & 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.
- 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.
- Despres, J. P., & Lemieux, I. (2006). Abdominal obesity and metabolic syndrome. *Nature*, 444(7121), 881-887.
- Diaz-Rua, R., Keijer, J., Palou, A., van Schothorst, E. M., & Oliver, P. (2017). Longterm intake of a high-protein diet increases liver triacylglycerol deposition pathways and hepatic signs of injury in rats. *J Nutr Biochem*, *46*, 39-48.
- Dierick, N., Michiels, J., & Van Nevel, C. (2004). Effect of medium chain fatty acids and benzoic acid, as alternatives for antibiotics, on growth and some gut parameters in piglets. *Commun Agric Appl Biol Sci*, 69(2), 187-190.
- Dietrich, P., & Hellerbrand, C. (2014). Non-alcoholic fatty liver disease, obesity and the metabolic syndrome. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 28(4), 637-653.
- Dijk, W., & Kersten, S. (2016). Regulation of lipid metabolism by angiopoietin-like proteins. *Curr Opin Lipidol, 27*(3), 249-256.
- Dijk, W., Ruppert, P. M. M., Oost, L. J., & Kersten, S. (2018). Angiopoietin-like 4 promotes the intracellular cleavage of lipoprotein lipase by PCSK3/furin in adipocytes. *The Journal of biological chemistry*, 293(36), 14134-14145.

- Diraison, F., Moulin, P., & Beylot, M. (2003). Contribution of hepatic de novo lipogenesis and reesterification of plasma non esterified fatty acids to plasma triglyceride synthesis during non-alcoholic fatty liver disease. *Diabetes Metab*, 29(5), 478-485.
- Dixon, L. J., Barnes, M., Tang, H., Pritchard, M. T., & Nagy, L. E. (2013). Kupffer Cells in the Liver. *Comprehensive Physiology*, 3(2), 785-797.
- Doege, H., & Stahl, A. (2006). Protein-Mediated Fatty Acid Uptake: Novel Insights from In Vivo Models. *Physiology*, 21(4), 259-268.
- Donadelli, M., Dando, I., Fiorini, C., & Palmieri, M. (2014). UCP2, a mitochondrial protein regulated at multiple levels. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 71(7), 1171-1190.
- Donnelly, K. L., Smith, C. I., Schwarzenberg, S. J., Jessurun, J., Boldt, M. D., & Parks, E. J. (2005). Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Invest*, 115(5), 1343-1351.
- Dorn, C., Riener, M. O., Kirovski, G., Saugspier, M., Steib, K., Weiss, T. S., Gabele, E., Kristiansen, G., Hartmann, A., & Hellerbrand, C. (2010). Expression of fatty acid synthase in nonalcoholic fatty liver disease. *Int J Clin Exp Pathol*, 3(5), 505-514.
- Dostálová, J., Hanzl ÍK, P., Réblová, Z., & PokornÝ, J. A. N. (2005). Oxidative Changes of Vegetable Oils during Microwave Heating (Vol. 23).
- Dragano, N. R. V., Solon, C., Ramalho, A. F., de Moura, R. F., Razolli, D. S., Christiansen, E., Azevedo, C., Ulven, T., & Velloso, L. A. (2017). Polyunsaturated fatty acid receptors, GPR40 and GPR120, are expressed in the hypothalamus and control energy homeostasis and inflammation. *Journal of Neuroinflammation*, 14(1), 91.
- Draznin, B. (2006). Molecular Mechanisms of Insulin Resistance: Serine Phosphorylation of Insulin Receptor Substrate-1 and Increased Expression of p85α. *The Two Sides of a Coin*, *55*(8), 2392-2397.
- Drewnowski, A., & Almiron-Roig, E. (2010). Frontiers in Neuroscience Human Perceptions and Preferences for Fat-Rich Foods. In J. P. Montmayeur & J. le Coutre (Eds.), *Fat Detection: Taste, Texture, and Post Ingestive Effects*. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis Group, LLC.

- Drucker, D. J. (2006). The biology of incretin hormones. *Cell Metabolism*, 3(3), 153-165.
- Ducheix, S., Montagner, A., Theodorou, V., Ferrier, L., & Guillou, H. (2013). The liver X receptor: a master regulator of the gut-liver axis and a target for non alcoholic fatty liver disease. *Biochem Pharmacol*, *86*(1), 96-105.
- Dulloo, A. G., Fathi, M., Mensi, N., & Girardier, L. (1996). Twenty-four-hour energy expenditure and urinary catecholamines of humans consuming low-tomoderate amounts of medium-chain triglycerides: a dose-response study in a human respiratory chamber. *Eur J Clin Nutr*, 50(3), 152-158.
- Dumitrascu, D. L., & Neuman, M. G. (2018). Non-alcoholic fatty liver disease: an update on diagnosis. *Clujul Med*, 91(2), 147-150.
- Ebbert, J. O., & Jensen, M. D. (2013). Fat depots, free fatty acids, and dyslipidemia. *Nutrients*, 5(2), 498-508.
- Eckel, N., Meidtner, K., Kalle-Uhlmann, T., Stefan, N., & Schulze, M. B. (2015). Metabolically healthy obesity and cardiovascular events: A systematic review and meta-analysis. *Eur J Prev Cardiol*.
- Eckel, R. H., Kahn, S. E., Ferrannini, E., Goldfine, A. B., Nathan, D. M., Schwartz, M. W., Smith, R. J., & Smith, S. R. (2011). Obesity and type 2 diabetes: what can be unified and what needs to be individualized? *J Clin Endocrinol Metab*, 96(6), 1654-1663.
- Eichmann, T. O., Kumari, M., Haas, J. T., Farese, R. V., Jr., Zimmermann, R., Lass, A., & Zechner, R. (2012). Studies on the substrate and stereo/regioselectivity of adipose triglyceride lipase, hormone-sensitive lipase, and diacylglycerol-Oacyltransferases. *J Biol Chem*, 287(49), 41446-41457.
- Elmaogullari, S., Tepe, D., Ucakturk, S. A., Karaca Kara, F., & Demirel, F. (2015). Prevalence of Dyslipidemia and Associated Factors in Obese Children and Adolescents. *J Clin Res Pediatr Endocrinol*, 7(3), 228-234.
- Endo, M., Masaki, T., Seike, M., & Yoshimatsu, H. (2007). TNF-alpha induces hepatic steatosis in mice by enhancing gene expression of sterol regulatory element binding protein-1c (SREBP-1c). *Exp Biol Med (Maywood), 232*(5), 614-621.
- Engin, A. (2017a). The Definition and Prevalence of Obesity and Metabolic Syndrome. *Adv Exp Med Biol, 960*, 1-17.
- Engin, A. B. (2017b). What Is Lipotoxicity? Adv Exp Med Biol, 960, 197-220.

- Epand, R. F., Martinou, J. C., Montessuit, S., & Epand, R. M. (2004). Fatty acids enhance membrane permeabilization by pro-apoptotic Bax. *Biochem J*, 377(Pt 2), 509-516.
- Evangelou, P., Tzotzas, T., Christou, G., Elisaf, M. S., & Kiortsis, D. N. (2010). Does the presence of metabolic syndome influence weight loss in obese and overweight women? *Metab Syndr Relat Disord*, 8(2), 173-178.
- Everard, A., & Cani, P. D. (2013). Diabetes, obesity and gut microbiota. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 27(1), 73-83.
- Eyres, L., Eyres, M. F., Chisholm, A., & Brown, R. C. (2016). Coconut oil consumption and cardiovascular risk factors in humans. *Nutr Rev*, 74(4), 267-280.
- Fabbrini, E., Sullivan, S., & Klein, S. (2010). Obesity and nonalcoholic fatty liver disease: biochemical, metabolic, and clinical implications. *Hepatology*, 51(2), 679-689.
- Faitg, J., Leduc-Gaudet, J. P., Reynaud, O., & Gouspillou, G. (2018). The effect of aging and calorie restriction on mitochondrial morphology and dynamic in oxidative and glycolytic skeletal muscles. *The FASEB Journal*, 32(1 supplement), lb481-lb481.
- Farese, R. V., Jr., & Walther, T. C. (2009). Lipid droplets finally get a little R-E-S-P-E-C-T. *Cell*, 139(5), 855-860.
- Fatima, A., Waters, S., O'Boyle, P., Seoighe, C., & Morris, D. G. (2014). Alterations in hepatic miRNA expression during negative energy balance in postpartum dairy cattle. *BMC Genomics*, 15, 28.
- Fehrenbach, H. (2001). Alveolar epithelial type II cell: defender of the alveolus revisited. *Respiratory research*, 2(1), 33-46.
- Feldstein, A. E., Werneburg, N. W., Canbay, A., Guicciardi, M. E., Bronk, S. F., Rydzewski, R., Burgart, L. J., & Gores, G. J. (2004). Free fatty acids promote hepatic lipotoxicity by stimulating TNF-alpha expression via a lysosomal pathway. *Hepatology*, 40(1), 185-194.
- Feng, B., Yao, P. M., Li, Y., Devlin, C. M., Zhang, D., Harding, H. P., Sweeney, M., Rong, J. X., Kuriakose, G., Fisher, E. A., Marks, A. R., Ron, D., & Tabas, I. (2003). The endoplasmic reticulum is the site of cholesterol-induced cytotoxicity in macrophages. *Nat Cell Biol*, 5(9), 781-792.

- Festuccia, W. T., Laplante, M., Berthiaume, M., Gelinas, Y., Deshaies, Y., & . (2006). PPARgamma agonism increases rat adipose tissue lipolysis, expression of glyceride lipases, and the response of lipolysis to hormonal control. *Diabetologia*, 49(10), 2427-2436.
- Field, A. E., Malspeis, S., & Willett, W. C. (2009). Weight cycling and mortality among middle-aged or older women. *Arch Intern Med*, 169(9), 881-886.
- Fischer, I. P., Irmler, M., Meyer, C. W., Sachs, S. J., Neff, F., Hrabě de Angelis, M., Beckers, J., Tschöp, M. H., Hofmann, S. M., & Ussar, S. (2018). A history of obesity leaves an inflammatory fingerprint in liver and adipose tissue. *International journal of obesity (2005), 42*(3), 507-517.
- Fisher, F. M., Kleiner, S., Douris, N., Fox, E. C., Mepani, R. J., Verdeguer, F., Wu, J., Kharitonenkov, A., Flier, J. S., Maratos-Flier, E., & Spiegelman, B. M. (2012). FGF21 regulates PGC-1alpha and browning of white adipose tissues in adaptive thermogenesis. *Genes Dev*, 26(3), 271-281.
- Flowers, M. T., & Ntambi, J. M. (2008). Role of stearoyl-coenzyme A desaturase in regulating lipid metabolism. *Curr Opin Lipidol, 19*(3), 248-256.
- Foster, D. A., Salloum, D., Menon, D., & Frias, M. A. (2014). Phospholipase D and the maintenance of phosphatidic acid levels for regulation of mammalian target of rapamycin (mTOR). *J Biol Chem*, 289(33), 22583-22588.
- Frangioudakis, G., Burchfield, J. G., Narasimhan, S., Cooney, G. J., Leitges, M., Biden, T. J., & Schmitz-Peiffer, C. (2009). Diverse roles for protein kinase C delta and protein kinase C epsilon in the generation of high-fat-diet-induced glucose intolerance in mice: regulation of lipogenesis by protein kinase C delta. *Diabetologia*, 52(12), 2616-2620.
- Frayn, K. N., Arner, P., & Yki-Jarvinen, H. (2006). Fatty acid metabolism in adipose tissue, muscle and liver in health and disease. *Essays in biochemistry*, *42*, 89-103.
- Friend, D. M., Devarakonda, K., O'Neal, T. J., Skirzewski, M., Papazoglou, I., Kaplan, A. R., Liow, J. S., Guo, J., Rane, S. G., Rubinstein, M., Alvarez, V. A., Hall, K. D., & Kravitz, A. V. (2017). Basal Ganglia Dysfunction Contributes to Physical Inactivity in Obesity. *Cell Metab*, 25(2), 312-321.
- Fromenty, B., Robin, M. A., Igoudjil, A., Mansouri, A., & Pessayre, D. (2004). The ins and outs of mitochondrial dysfunction in NASH. *Diabetes Metab*, 30(2), 121-138.
- Fryer, L. G. D., Foufelle, F., Barnes, K., Baldwin, S. A., Woods, A., & Carling, D. (2002). Characterization of the role of the AMP-activated protein kinase in the stimulation of glucose transport in skeletal muscle cells. *The Biochemical journal*, 363(Pt 1), 167-174.
- Fu, S., Watkins, S. M., & Hotamisligil, G. S. (2012). The role of endoplasmic reticulum in hepatic lipid homeostasis and stress signaling. *Cell Metab*, *15*(5), 623-634.
- Fujii, H., Ikura, Y., Arimoto, J., Sugioka, K., Iezzoni, J. C., Park, S. H., Naruko, T., Itabe, H., Kawada, N., Caldwell, S. H., & Ueda, M. (2009). Expression of perilipin and adipophilin in nonalcoholic fatty liver disease; relevance to oxidative injury and hepatocyte ballooning. *J Atheroscler Thromb*, 16(6), 893-901.
- Fuller-Jackson, J. P., & Henry, B. A. (2018). Adipose and skeletal muscle thermogenesis: studies from large animals. *J Endocrinol*, 237(3), R99-r115.
- Furet, J. P., Kong, L. C., Tap, J., Poitou, C., Basdevant, A., Bouillot, J. L., Mariat, D., Corthier, G., Dore, J., Henegar, C., Rizkalla, S., & Clement, K. (2010). Differential adaptation of human gut microbiota to bariatric surgery-induced weight loss: links with metabolic and low-grade inflammation markers. *Diabetes*, 59(12), 3049-3057.
- Gagné, C., Gaudet, D., Université Laval, C. d. r. s. l. m. l. S., lipidiques, U. L. C. d. r. s. l. m., Chicoutimi, C. d. s. e. d. s. s. d., Université de Montréal, C. d. m. g. c. S., & communautaire, U. d. M. C. d. m. g. (2007). Les Dyslipoprotéinémies: L'approche Clinique: Claude Gagne.
- Gagnon, L., Leduc, M., Thibodeau, J.-F., Zhang, M.-Z., Grouix, B., Sarra-Bournet, F., Gagnon, W., Hince, K., Tremblay, M., Geerts, L., Kennedy, C. R. J., Hébert, R. L., Gutsol, A., Holterman, C. E., Kamto, E., Gervais, L., Ouboudinar, J., Richard, J., Felton, A., Laverdure, A., Simard, J.-C., Létourneau, S., Cloutier, M.-P., Leblond, F. A., Abbott, S. D., Penney, C., Duceppe, J.-S., Zacharie, B., Dupuis, J., Calderone, A., Nguyen, Q. T., Harris, R. C., & Laurin, P. (2018). A Newly Discovered Antifibrotic Pathway Regulated by Two Fatty Acid Receptors: GPR40 and GPR84. *The American Journal of Pathology, 188*(5), 1132-1148.
- Galbo, T., Perry, R. J., Jurczak, M. J., Camporez, J. P., Alves, T. C., Kahn, M., Guigni, B. A., Serr, J., Zhang, D., Bhanot, S., Samuel, V. T., & Shulman, G. I. (2013). Saturated and unsaturated fat induce hepatic insulin resistance independently of TLR-4 signaling and ceramide synthesis in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(31), 12780-12785.

- Galsgaard, K. D., Pedersen, J., Knop, F. K., Holst, J. J., & Wewer Albrechtsen, N. J. (2019). Glucagon Receptor Signaling and Lipid Metabolism. *Front Physiol*, 10, 413.
- Gao, D., Griffiths, H. R., & Bailey, C. J. (2009). Oleate protects against palmitateinduced insulin resistance in L6 myotubes. *Br J Nutr, 102*(11), 1557-1563.
- Gao, D., Nong, S., Huang, X., Lu, Y., Zhao, H., Lin, Y., Man, Y., Wang, S., Yang, J., & Li, J. (2010). The effects of palmitate on hepatic insulin resistance are mediated by NADPH Oxidase 3-derived reactive oxygen species through JNK and p38MAPK pathways. *J Biol Chem*, 285(39), 29965-29973.
- Gao, M., Ma, Y., & Liu, D. (2015). High-Fat Diet-Induced Adiposity, Adipose Inflammation, Hepatic Steatosis and Hyperinsulinemia in Outbred CD-1 Mice. *PLoS One, 10*(3), e0119784.
- Garcia-Ruiz, I., Solis-Munoz, P., Fernandez-Moreira, D., Munoz-Yague, T., & Solis-Herruzo, J. A. (2015). In vitro treatment of HepG2 cells with saturated fatty acids reproduces mitochondrial dysfunction found in nonalcoholic steatohepatitis. *Dis Model Mech*, 8(2), 183-191.
- Gautier, J. F., Fetita, S., Sobngwi, E., & Salaun-Martin, C. (2005). Biological actions of the incretins GIP and GLP-1 and therapeutic perspectives in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Metab*, *31*(3 Pt 1), 233-242.
- Geng, S., Zhu, W., Xie, C., Li, X., Wu, J., Liang, Z., Xie, W., Zhu, J., Huang, C., Zhu, M., Wu, R., & Zhong, C. (2016). Medium-chain triglyceride ameliorates insulin resistance and inflammation in high fat diet-induced obese mice. *Eur J Nutr*, 55(3), 931-940.
- Gesta, S., Tseng, Y.-H., & Kahn, C. R. (2007). Developmental Origin of Fat: Tracking Obesity to Its Source. *Cell*, 131(2), 242-256.
- Ghaben, A. L., & Scherer, P. E. (2019). Adipogenesis and metabolic health. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 20(4), 242-258.
- Giampietro, L., Laghezza, A., Cerchia, C., Florio, R., Recinella, L., Capone, F., Ammazzalorso, A., Bruno, I., De Filippis, B., Fantacuzzi, M., Ferrante, C., Maccallini, C., Tortorella, P., Verginelli, F., Brunetti, L., Cama, A., Amoroso, R., Loiodice, F., & Lavecchia, A. (2019). Novel Phenyldiazenyl Fibrate Analogues as PPAR alpha/gamma/delta Pan-Agonists for the Amelioration of Metabolic Syndrome. ACS Med Chem Lett, 10(4), 545-551.

- Gilardini, L., Vallone, L., Cottafava, R., Redaelli, G., Croci, M., Conti, A., Pasqualinotto, L., & Invitti, C. (2012). Insulin sensitivity deteriorates after short-term lifestyle intervention in the insulin sensitive phenotype of obesity. *Obes Facts*, 5(1), 68-76.
- Gimeno, R. E. (2007). Fatty acid transport proteins. Curr Opin Lipidol, 18(3), 271-276.
- Goldberg, I. J., Eckel, R. H., & Abumrad, N. A. (2009). Regulation of fatty acid uptake into tissues: lipoprotein lipase- and CD36-mediated pathways. *Journal of lipid research, 50 Suppl*, S86-90.
- González-García, I., Milbank, E., Diéguez, C., López, M., & Contreras, C. (2019). Glucagon, GLP-1 and Thermogenesis. *International journal of molecular sciences*, 20(14), 3445.
- Goodridge, A. G., Thurmond, D. C., Baillie, R. A., Hodnett, D. W., & Xu, G. (1998). Nutritional and hormonal regulation of the gene for malic enzyme. *Z Ernahrungswiss, 37 Suppl 1*, 8-13.
- Gormaz, J. G., Rodrigo, R., Videla, L. A., & Beems, M. (2010). Biosynthesis and bioavailability of long-chain polyunsaturated fatty acids in non-alcoholic fatty liver disease. *Progress in lipid research*, 49(4), 407-419.
- Graffy, P. M., & Pickhardt, P. J. (2016). Quantification of hepatic and visceral fat by CT and MR imaging: relevance to the obesity epidemic, metabolic syndrome and NAFLD. *Br J Radiol*, 20151024.
- Graham, S. A. (1989). Cuphea: a new plant source of medium-chain fatty acids. *Crit Rev Food Sci Nutr, 28*(2), 139-173.
- Green, B. D., Irwin, N., Gault, V. A., Bailey, C. J., O'Harte, F. P., & Flatt, P. R. (2005). Chronic treatment with exendin(9-39)amide indicates a minor role for endogenous glucagon-like peptide-1 in metabolic abnormalities of obesityrelated diabetes in ob/ob mice. *J Endocrinol*, 185(2), 307-317.
- Griffett, K., Solt, L. A., El-Gendy Bel, D., Kamenecka, T. M., & Burris, T. P. (2013). A liver-selective LXR inverse agonist that suppresses hepatic steatosis. ACS Chem Biol, 8(3), 559-567.
- Grover, S. A., Kaouache, M., Rempel, P., Joseph, L., Dawes, M., Lau, D. C., & Lowensteyn, I. (2015). Years of life lost and healthy life-years lost from diabetes and cardiovascular disease in overweight and obese people: a modelling study. *Lancet Diabetes Endocrinol*, 3(2), 114-122.

Grundy, S. M. (2015). Metabolic syndrome update. Trends Cardiovasc Med.

- Grygiel-Górniak, B. (2014). Peroxisome proliferator-activated receptors and their ligands: nutritional and clinical implications--a review. *Nutrition journal*, 13, 17-17.
- Gu, G., Dubauskaite, J., & Melton, D. A. (2002). Direct evidence for the pancreatic lineage: NGN3+ cells are islet progenitors and are distinct from duct progenitors. *Development*, 129(10), 2447-2457.
- Gual, P., Gilgenkrantz, H., & Lotersztajn, S. (2017). Autophagy in chronic liver diseases: the two faces of Janus. *Am J Physiol Cell Physiol*, *312*(3), C263-C273.
- Guillot, E., Vaugelade, P., Lemarchal, P., & Rerat, A. (1993). Intestinal absorption and liver uptake of medium-chain fatty acids in non-anaesthetized pigs. *Br J Nutr*, 69(2), 431-442.
- Guimarães, J., Bargut, T. C. L., Mandarim-de-Lacerda, C. A., & Aguila, M. B. (2019). Medium-chain triglyceride reinforce the hepatic damage caused by fructose intake in mice. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 140, 64-71.
- Guinane, C. M., & Cotter, P. D. (2013). Role of the gut microbiota in health and chronic gastrointestinal disease: understanding a hidden metabolic organ. *Therapeutic Advances in Gastroenterology*, 6(4), 295-308.
- Guo, W., Huang, N., Cai, J., Xie, W., & Hamilton, J. A. (2006). Fatty acid transport and metabolism in HepG2 cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 290(3), G528-534.
- Guo, W., Lei, T., Wang, T., Corkey, B. E., & Han, J. (2003). Octanoate Inhibits Triglyceride Synthesis in 3T3-L1 and Human Adipocytes. *J Nutr*, 133(8), 2512-2518.
- Guo, Y., Cordes, K. R., Farese, R. V., Jr., & Walther, T. C. (2009). Lipid droplets at a glance. *J Cell Sci*, 122(Pt 6), 749-752.
- Gupta, R. K., Arany, Z., Seale, P., Mepani, R. J., Ye, L., Conroe, H. M., Roby, Y. A., Kulaga, H., Reed, R. R., & Spiegelman, B. M. (2010). Transcriptional control of preadipocyte determination by Zfp423. *Nature*, 464(7288), 619-623.
- Gurnell, M., Savage, D. B., Chatterjee, V. K. K., & O'Rahilly, S. (2003). The Metabolic Syndrome: Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ and Its Therapeutic Modulation. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 88(6), 2412-2421.

- Haataja, Tatu J. K., Koski, M. K., Hiltunen, J. K., & Glumoff, T. (2011). Peroxisomal multifunctional enzyme type 2 from the fruitfly: dehydrogenase and hydratase act as separate entities, as revealed by structure and kinetics. *Biochemical Journal*, 435(3), 771-781.
- Habets, D. D. J., Coumans, W. A., El Hasnaoui, M., Zarrinpashneh, E., Bertrand, L., Viollet, B., Kiens, B., Jensen, T. E., Richter, E. A., Bonen, A., Glatz, J. F. C., & Luiken, J. J. F. P. (2009). Crucial role for LKB1 to AMPKα2 axis in the regulation of CD36-mediated long-chain fatty acid uptake into cardiomyocytes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1791(3), 212-219.
- Haidukewych, D., Forsythe, W. I., & Sills, M. (1982). Monitoring octanoic and decanoic acids in plasma from children with intractable epilepsy treated with medium-chain triglyceride diet. *Clin Chem*, 28(4 Pt 1), 642-645.
- Haldar, C., Fukada, Y., & Araki, M. (2003). Effects of gonadal steroids on pineal morphogenesis and cell differentiation of the embryonic quail studied under cell culture conditions. *Brain Res Dev Brain Res*, 145(1), 71-79.
- Hamm, P., Shekelle, R. B., & Stamler, J. (1989). Large fluctuations in body weight during young adulthood and twenty-five-year risk of coronary death in men. *Am J Epidemiol*, *129*(2), 312-318.
- Han, D., & Kaplowitz, N. (2015). Mitochondria in Liver Disease: CRC Press.
- Han, J., Hamilton, J. A., Kirkland, J. L., Corkey, B. E., & Guo, W. (2003). Mediumchain oil reduces fat mass and down-regulates expression of adipogenic genes in rats. *Obes Res*, 11(6), 734-744.
- Hannah, V. C., Ou, J., Luong, A., Goldstein, J. L., & Brown, M. S. (2001). Unsaturated fatty acids down-regulate srebp isoforms 1a and 1c by two mechanisms in HEK-293 cells. *J Biol Chem*, 276(6), 4365-4372.
- Hansson, B., Moren, B., Fryklund, C., Vliex, L., Wasserstrom, S., Albinsson, S., Berger, K., & Stenkula, K. G. (2019). Adipose cell size changes are associated with a drastic actin remodeling. *Sci Rep*, 9(1), 12941.
- Hardie, D. G. (2014). AMP-activated protein kinase: maintaining energy homeostasis at the cellular and whole-body levels. *Annual review of nutrition*, 34, 31-55.
- Hardie, D. G., Ross, F. A., & Hawley, S. A. (2012). AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 13(4), 251-262.

- Harms, M., & Seale, P. (2013). Brown and beige fat: development, function and therapeutic potential. *Nat Med*, 19(10), 1252-1263.
- Harvey-Berino, J. (1999). Calorie restriction is more effective for obesity treatment than dietary fat restriction. *Ann Behav Med*, 21(1), 35-39.
- Haslam, D. W., & James, W. P. (2005). Obesity. Lancet, 366(9492), 1197-1209.
- Heaton, N. S., & Randall, G. (2010). Dengue virus-induced autophagy regulates lipid metabolism. *Cell Host Microbe*, 8(5), 422-432.
- Heeren, J., & Scheja, L. (2018). Brown adipose tissue and lipid metabolism. *Curr Opin Lipidol, 29*(3), 180-185.
- Heim, M., Johnson, J., Boess, F., Bendik, I., Weber, P., Hunziker, W., & Fluhmann, B. (2002). Phytanic acid, a natural peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) agonist, regulates glucose metabolism in rat primary hepatocytes. *Faseb j*, 16(7), 718-720.
- Higashi, T., Friedman, S. L., & Hoshida, Y. (2017). Hepatic stellate cells as key target in liver fibrosis. *Advanced drug delivery reviews*, *121*, 27-42.
- Higuchi, N., Kato, M., Shundo, Y., Tajiri, H., Tanaka, M., Yamashita, N., Kohjima, M., Kotoh, K., Nakamuta, M., Takayanagi, R., & Enjoji, M. (2008). Liver X receptor in cooperation with SREBP-1c is a major lipid synthesis regulator in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatol Res*, 38(11), 1122-1129.
- Hill, J. O., Peters, J. C., Yang, D., Sharp, T., Kaler, M., Abumrad, N. N., & Greene, H. L. (1989). Thermogenesis in humans during overfeeding with medium-chain triglycerides. *Metabolism*, 38(7), 641-648.
- Himms-Hagen, J., Melnyk, A., Zingaretti, M. C., Ceresi, E., Barbatelli, G., & Cinti, S. (2000). Multilocular fat cells in WAT of CL-316243-treated rats derive directly from white adipocytes. *Am J Physiol Cell Physiol*, 279(3), C670-681.
- Hiyoshi, T., Fujiwara, M., & Yao, Z. (2017). Postprandial hyperglycemia and postprandial hypertriglyceridemia in type 2 diabetes. *Journal of biomedical research*, 33(1), 1-16.
- Ho, K. K. Y. (2018). Diet-induced thermogenesis: fake friend or foe?, 238(3), R185.
- Holness, C. L., & Simmons, D. L. (1993). Molecular cloning of CD68, a human macrophage marker related to lysosomal glycoproteins. *Blood*, 81(6), 1607-1613.

- Hondares, E., Rosell, M., Gonzalez, F. J., Giralt, M., Iglesias, R., & Villarroya, F. (2010). Hepatic FGF21 expression is induced at birth via PPARalpha in response to milk intake and contributes to thermogenic activation of neonatal brown fat. *Cell Metabolism*, 11(3), 206-212.
- Hooper, A. J., Adams, L. A., & Burnett, J. R. (2011). Genetic determinants of hepatic steatosis in man. *Journal of lipid research*, 52(4), 593-617.
- Hryhorczuk, C., Sharma, S., & Fulton, S. E. (2013). Metabolic disturbances connecting obesity and depression. *Front Neurosci*, *7*, 177.
- Hu, D., Xu, Y., Xie, J., Sun, C., Zheng, X., & Chen, W. (2018). Systematic evaluation of phenolic compounds and protective capacity of a new mulberry cultivar J33 against palmitic acid-induced lipotoxicity using a simulated digestion method. *Food Chem*, 258, 43-50.
- Hu, J., Zhang, Z., Shen, W. J., & Azhar, S. (2010). Cellular cholesterol delivery, intracellular processing and utilization for biosynthesis of steroid hormones. *Nutr Metab (Lond)*, 7, 47.
- Hu, J. N., Zhang, B., Zhu, X. M., Li, J., Fan, Y. W., Liu, R., Tang, L., Lee, K. T., & Deng, Z. Y. (2011). Characterization of medium-chain triacylglycerol (MCT)enriched seed oil from Cinnamomum camphora (Lauraceae) and its oxidative stability. *J Agric Food Chem*, 59(9), 4771-4778.
- Huang, H., Dai, M. H., & Tao, Y. X. (2014). Physiology and therapeutics of the free fatty acid receptor GPR40. *Prog Mol Biol Transl Sci, 121*, 67-94.
- Hue, O., Marcotte, J., Berrigan, F., Simoneau, M., Dore, J., Marceau, P., Marceau, S., Tremblay, A., & Teasdale, N. (2006). Increased plasma levels of toxic pollutants accompanying weight loss induced by hypocaloric diet or by bariatric surgery. *Obes Surg*, 16(9), 1145-1154.
- Hughes, S. D., Kanabus, M., Anderson, G., Hargreaves, I. P., Rutherford, T., O'Donnell, M., Cross, J. H., Rahman, S., Eaton, S., & Heales, S. J. (2014). The ketogenic diet component decanoic acid increases mitochondrial citrate synthase and complex I activity in neuronal cells. *J Neurochem*, 129(3), 426-433.
- Hui, H., Nourparvar, A., Zhao, X., & Perfetti, R. (2003). Glucagon-Like Peptide-1 Inhibits Apoptosis of Insulin-Secreting Cells via a Cyclic 5' -Adenosine Monophosphate-Dependent Protein Kinase A- and a Phosphatidylinositol 3-Kinase-Dependent Pathway. *Endocrinology*, 144(4), 1444-1455.

- Hur, K. Y., & Lee, M. S. (2015). Gut Microbiota and Metabolic Disorders. *Diabetes Metab J*, 39(3), 198-203.
- Hurtado-Carneiro, V., Sanz, C., Roncero, I., Vazquez, P., Blazquez, E., & Alvarez, E. (2012). Glucagon-like peptide 1 (GLP-1) can reverse AMP-activated protein kinase (AMPK) and S6 kinase (P70S6K) activities induced by fluctuations in glucose levels in hypothalamic areas involved in feeding behaviour. *Mol Neurobiol*, 45(2), 348-361.
- Hwang, D. H., Kim, J.-A., & Lee, J. Y. (2016). Mechanisms for the activation of Tolllike receptor 2/4 by saturated fatty acids and inhibition by docosahexaenoic acid. *European journal of pharmacology*, 785, 24-35.
- Iizuka, K., & Horikawa, Y. (2008). ChREBP: a glucose-activated transcription factor involved in the development of metabolic syndrome. *Endocr J*, 55(4), 617-624.
- Ikeda, K., Maretich, P., & Kajimura, S. (2018). The Common and Distinct Features of Brown and Beige Adipocytes. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 29(3), 191-200.
- Inoue, M., Ohtake, T., Motomura, W., Takahashi, N., Hosoki, Y., Miyoshi, S., Suzuki, Y., Saito, H., Kohgo, Y., & Okumura, T. (2005). Increased expression of PPARgamma in high fat diet-induced liver steatosis in mice. *Biochem Biophys Res Commun*, 336(1), 215-222.
- Isaacs, C. E. (2001). The antimicrobial function of milk lipids. *Adv Nutr Res, 10*, 271-285.
- Ishii, M., Maeda, A., Tani, S., & Akagawa, M. (2015). Palmitate induces insulin resistance in human HepG2 hepatocytes by enhancing ubiquitination and proteasomal degradation of key insulin signaling molecules. Arch Biochem Biophys, 566, 26-35.
- Ishizawa, R., Masuda, K., Sakata, S., & Nakatani, A. (2015). Effects of different fatty acid chain lengths on fatty acid oxidation-related protein expression levels in rat skeletal muscles. *J Oleo Sci*, *64*(4), 415-421.
- Jacobi, S. K., & Odle, J. (2012). Nutritional factors influencing intestinal health of the neonate. *Advances in nutrition (Bethesda, Md.), 3*(5), 687-696.
- Jacquier, N., Choudhary, V., Mari, M., Toulmay, A., Reggiori, F., & Schneiter, R. (2011). Lipid droplets are functionally connected to the endoplasmic reticulum in Saccharomyces cerevisiae. *J Cell Sci, 124*(Pt 14), 2424-2437.

- Jacquier, N., Mishra, S., Choudhary, V., & Schneiter, R. (2013). Expression of oleosin and perilipins in yeast promotes formation of lipid droplets from the endoplasmic reticulum. *J Cell Sci, 126*(Pt 22), 5198-5209.
- Jager, S., Handschin, C., St-Pierre, J., & Spiegelman, B. M. (2007). AMP-activated protein kinase (AMPK) action in skeletal muscle via direct phosphorylation of PGC-1alpha. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 104(29), 12017-12022.
- Jäger, S., Handschin, C., St-Pierre, J., & Spiegelman, B. M. (2007). AMP-activated protein kinase (AMPK) action in skeletal muscle via direct phosphorylation of PGC-1alpha. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 104(29), 12017-12022.
- Jaishy, B., & Abel, E. D. (2016). Lipids, lysosomes, and autophagy. *Journal of lipid* research, 57(9), 1619-1635.
- Janani, C., & Ranjitha Kumari, B. D. (2015). PPAR gamma gene--a review. *Diabetes Metab Syndr*, 9(1), 46-50.
- Janiszewski, P. M., & Ross, R. (2010). Effects of weight loss among metabolically healthy obese men and women. *Diabetes Care*, 33(9), 1957-1959.
- Janssen, A. W., & Kersten, S. (2015). The role of the gut microbiota in metabolic health. *Faseb j, 29*(8), 3111-3123.
- Jarrett, K. E., Lee, C. M., Yeh, Y.-H., Hsu, R. H., Gupta, R., Zhang, M., Rodriguez, P. J., Lee, C. S., Gillard, B. K., Bissig, K.-D., Pownall, H. J., Martin, J. F., Bao, G., & Lagor, W. R. (2017). Somatic genome editing with CRISPR/Cas9 generates and corrects a metabolic disease. *Scientific Reports*, 7, 44624-44624.
- Jensen, R. G. (2002). The composition of bovine milk lipids: January 1995 to December 2000. *J Dairy Sci*, 85(2), 295-350.
- Jeyapal, S., Kona, S. R., Mullapudi, S. V., Putcha, U. K., Gurumurthy, P., & Ibrahim, A. (2018). Substitution of linoleic acid with α-linolenic acid or long chain n-3 polyunsaturated fatty acid prevents Western diet induced nonalcoholic steatohepatitis. *Scientific Reports*, 8(1), 10953.
- Jezek, P., Holendova, B., Garlid, K. D., & Jaburek, M. (2018). Mitochondrial Uncoupling Proteins: Subtle Regulators of Cellular Redox SignalingReviewing Editors: Jerzy Beltowski, Joseph Burgoyne, Gabor Csanyi, Sergey Dikalov, Frank Krause, Anibal Vercesi, and Jeremy Ward. Antioxidants & Redox Signaling, 29(7), 667-714.

- Jiang, X. S., Chen, X. M., Wan, J. M., Gui, H. B., Ruan, X. Z., & Du, X. G. (2017). Autophagy Protects against Palmitic Acid-Induced Apoptosis in Podocytes in vitro. Sci Rep, 7, 42764.
- Jocken, J. W., Smit, E., Goossens, G. H., Essers, Y. P., van Baak, M. A., Mensink, M., Saris, W. H., & Blaak, E. E. (2008). Adipose triglyceride lipase (ATGL) expression in human skeletal muscle is type I (oxidative) fiber specific. *Histochem Cell Biol*, 129(4), 535-538.
- Johnson, T. A., Stedtfeld, R. D., Wang, Q., Cole, J. R., Hashsham, S. A., Looft, T., Zhu, Y. G., & Tiedje, J. M. (2016). Clusters of Antibiotic Resistance Genes Enriched Together Stay Together in Swine Agriculture. *MBio*, 7(2).
- Jorgensen, S. B., Nielsen, J. N., Birk, J. B., Olsen, G. S., Viollet, B., Andreelli, F., Schjerling, P., Vaulont, S., Hardie, D. G., Hansen, B. F., Richter, E. A., & Wojtaszewski, J. F. (2004). The alpha2-5'AMP-activated protein kinase is a site 2 glycogen synthase kinase in skeletal muscle and is responsive to glucose loading. *Diabetes*, 53(12), 3074-3081.
- Jornayvaz, F. R., & Shulman, G. I. (2010). Regulation of mitochondrial biogenesis. *Essays in biochemistry*, 47, 69-84.
- Kaila, B., & Raman, M. (2008). Obesity: a review of pathogenesis and management strategies. *Can J Gastroenterol*, 22(1), 61-68.
- Kaku, K., Enya, K., Nakaya, R., Ohira, T., & Matsuno, R. (2015). Efficacy and safety of fasiglifam (TAK-875), a G protein-coupled receptor 40 agonist, in Japanese patients with type 2 diabetes inadequately controlled by diet and exercise: a randomized, double-blind, placebo-controlled, phase III trial. *Diabetes, obesity* & metabolism, 17(7), 675-681.
- Kamijo, T., Wanders, R. J., Saudubray, J. M., Aoyama, T., Komiyama, A., & Hashimoto, T. (1994). Mitochondrial trifunctional protein deficiency. Catalytic heterogeneity of the mutant enzyme in two patients. *J Clin Invest*, 93(4), 1740-1747.
- Kanayama, T., Kobayashi, N., Mamiya, S., Nakanishi, T., & Nishikawa, J. (2005). Organotin compounds promote adipocyte differentiation as agonists of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma/retinoid X receptor pathway. *Mol Pharmacol*, 67(3), 766-774.
- Kandasamy, A. D., Sung, M. M., Boisvenue, J. J., Barr, A. J., & Dyck, J. R. (2012). Adiponectin gene therapy ameliorates high-fat, high-sucrose diet-induced metabolic perturbations in mice. *Nutr Diabetes*, 2, e45.

- Kantartzis, K., Machann, J., Schick, F., Rittig, K., Machicao, F., Fritsche, A., Haring, H. U., & Stefan, N. (2011). Effects of a lifestyle intervention in metabolically benign and malign obesity. *Diabetologia*, 54(4), 864-868.
- Kantartzis, K., Machicao, F., Machann, J., Schick, F., Fritsche, A., Haring, H. U., & Stefan, N. (2009). The DGAT2 gene is a candidate for the dissociation between fatty liver and insulin resistance in humans. *Clin Sci (Lond)*, 116(6), 531-537.
- Kanuri, G., & Bergheim, I. (2013). In vitro and in vivo models of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *International journal of molecular sciences*, 14(6), 11963-11980.
- Kaplowitz, N., & Ji, C. (2006). Unfolding new mechanisms of alcoholic liver disease in the endoplasmic reticulum. *J Gastroenterol Hepatol, 21 Suppl 3*, S7-9.
- Karamanlidis, G., Karamitri, A., Docherty, K., Hazlerigg, D. G., Lomax, M. A., & na. (2007). C/EBPbeta reprograms white 3T3-L1 preadipocytes to a Brown adipocyte pattern of gene expression. *J Biol Chem*, 282(34), 24660-24669.
- Karelis, A. D. (2008). Metabolically healthy but obese individuals. *Lancet*, 372(9646), 1281-1283.
- Karelis, A. D., Messier, V., Brochu, M., & Rabasa-Lhoret, R. (2008). Metabolically healthy but obese women: effect of an energy-restricted diet. *Diabetologia*, 51(9), 1752-1754.
- Karlsson, M., Contreras, J. A., Hellman, U., Tornqvist, H., & Holm, C. (1997). cDNA cloning, tissue distribution, and identification of the catalytic triad of monoglyceride lipase. Evolutionary relationship to esterases, lysophospholipases, and haloperoxidases. *J Biol Chem*, 272(43), 27218-27223.
- Kasai, M., Nosaka, N., Maki, H., Negishi, S., Aoyama, T., Nakamura, M., Suzuki, Y., Tsuji, H., Uto, H., Okazaki, M., & Kondo, K. (2003). Effect of dietary mediumand long-chain triacylglycerols (MLCT) on accumulation of body fat in healthy humans. Asia Pac J Clin Nutr, 12(2), 151-160.
- Kaushik, S., & Cuervo, A. M. (2015). Degradation of lipid droplet-associated proteins by chaperone-mediated autophagy facilitates lipolysis. *Nat Cell Biol, 17*(6), 759-770.
- Kaushik, S., & Cuervo, A. M. (2016). AMPK-dependent phosphorylation of lipid droplet protein PLIN2 triggers its degradation by CMA. *Autophagy*, 12(2), 432-438.

- Kawata, M. (1995). Roles of steroid hormones and their receptors in structural organization in the nervous system. *Neurosci Res*, 24(1), 1-46.
- Kazantzis, M., & Stahl, A. (2012). Fatty acid transport proteins, implications in physiology and disease. *Biochimica et biophysica acta*, 1821(5), 852-857.
- Kelly, C. J., Zheng, L., Campbell, E. L., Saeedi, B., Scholz, C. C., Bayless, A. J., Wilson, K. E., Glover, L. E., Kominsky, D. J., Magnuson, A., Weir, T. L., Ehrentraut, S. F., Pickel, C., Kuhn, K. A., Lanis, J. M., Nguyen, V., Taylor, C. T., & Colgan, S. P. (2015). Crosstalk between Microbiota-Derived Short-Chain Fatty Acids and Intestinal Epithelial HIF Augments Tissue Barrier Function. *Cell Host Microbe, 17*(5), 662-671.
- Kerimi, A., Jailani, F., & Williamson, G. (2015). Modulation of cellular glucose metabolism in human HepG2 cells by combinations of structurally related flavonoids. *Mol Nutr Food Res*, 59(5), 894-906.
- Kershaw, E. E., Hamm, J. K., Verhagen, L. A., Peroni, O., Katic, M., & Flier, J. S. (2006). Adipose triglyceride lipase: function, regulation by insulin, and comparison with adiponutrin. *Diabetes*, 55(1), 148-157.
- Kersten, S. (2001). Mechanisms of nutritional and hormonal regulation of lipogenesis. *EMBO Rep*, 2(4), 282-286.
- Kessler, S. M., Simon, Y., Gemperlein, K., Gianmoena, K., Cadenas, C., Zimmer, V., Pokorny, J., Barghash, A., Helms, V., van Rooijen, N., Bohle, R. M., Lammert, F., Hengstler, J. G., Mueller, R., Haybaeck, J., & Kiemer, A. K. (2014). Fatty acid elongation in non-alcoholic steatohepatitis and hepatocellular carcinoma. *International journal of molecular sciences*, 15(4), 5762-5773.
- Khabbush, A., Orford, M., Tsai, Y. C., Rutherford, T., O'Donnell, M., Eaton, S., & Heales, S. J. R. (2017). Neuronal decanoic acid oxidation is markedly lower than that of octanoic acid: A mechanistic insight into the medium-chain triglyceride ketogenic diet. *Epilepsia*, 58(8), 1423-1429.
- Kiens, B., Lithell, H., Mikines, K. J., & Richter, E. A. (1989). Effects of insulin and exercise on muscle lipoprotein lipase activity in man and its relation to insulin action. *J Clin Invest*, 84(4), 1124-1129.
- Kihara, A. (2012). Very long-chain fatty acids: elongation, physiology and related disorders. *The Journal of Biochemistry*, 152(5), 387-395.
- Kim, E., Kim, E. J., Seo, S. W., Hur, C. G., McGregor, R. A., & Choi, M. S. (2014). Meta-review of protein network regulating obesity between validated obesity

candidate genes in the white adipose tissue of high-fat diet-induced obese C57BL/6J mice. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 54(7), 910-923.

- Kim, H., Choe, J. H., Choi, J. H., Kim, H. J., Park, S. H., Lee, M. W., Kim, W., & Go, G. W. (2017). Medium-Chain Enriched Diacylglycerol (MCE-DAG) Oil Decreases Body Fat Mass in Mice by Increasing Lipolysis and Thermogenesis in Adipose Tissue. *Lipids*, 52(8), 665-673.
- Kim, H., Wrann, C. D., Jedrychowski, M., Vidoni, S., Kitase, Y., Nagano, K., Zhou, C., Chou, J., Parkman, V.-J. A., Novick, S. J., Strutzenberg, T. S., Pascal, B. D., Le, P. T., Brooks, D. J., Roche, A. M., Gerber, K. K., Mattheis, L., Chen, W., Tu, H., Bouxsein, M. L., Griffin, P. R., Baron, R., Rosen, C. J., Bonewald, L. F., & Spiegelman, B. M. (2018). Irisin Mediates Effects on Bone and Fat via αV Integrin Receptors. *Cell*, 175(7), 1756-1768.e1717.
- Kim, M. J., Marchand, P., Henegar, C., Antignac, J. P., Alili, R., Poitou, C., Bouillot, J. L., Basdevant, A., Le Bizec, B., Barouki, R., & Clement, K. (2011). Fate and complex pathogenic effects of dioxins and polychlorinated biphenyls in obese subjects before and after drastic weight loss. *Environ Health Perspect*, 119(3), 377-383.
- Kim, S.-J., Tang, T., Abbott, M., Viscarra, J. A., Wang, Y., & Sul, H. S. (2016). AMPK Phosphorylates Desnutrin/ATGL and Hormone-Sensitive Lipase To Regulate Lipolysis and Fatty Acid Oxidation within Adipose Tissue. *Molecular and cellular biology*, 36(14), 1961-1976.
- Kimura, H., Nagoshi, T., Yoshii, A., Kashiwagi, Y., Tanaka, Y., Ito, K., Yoshino, T., Tanaka, T. D., & Yoshimura, M. (2017). The thermogenic actions of natriuretic peptide in brown adipocytes: The direct measurement of the intracellular temperature using a fluorescent thermoprobe. *Scientific Reports*, 7(1), 12978.
- King, S., Abughazaleh, A., Webel, S., & Jones, K. (2008). *Circulating fatty acid profiles in response to three levels of dietary omega-3 fatty acid supplementation in horses* (Vol. 86).
- Klingenberg, L., Sjodin, A., Holmback, U., Astrup, A., & Chaput, J. P. (2012). Short sleep duration and its association with energy metabolism. *Obes Rev, 13*(7), 565-577.
- Kohjima, M., Enjoji, M., Higuchi, N., Kato, M., Kotoh, K., Yoshimoto, T., Fujino, T., Yada, M., Yada, R., Harada, N., Takayanagi, R., & Nakamuta, M. (2007). Reevaluation of fatty acid metabolism-related gene expression in nonalcoholic fatty liver disease. *Int J Mol Med*, 20(3), 351-358.

- Kohlwein, S. D., Veenhuis, M., & van der Klei, I. J. (2013). Lipid droplets and peroxisomes: key players in cellular lipid homeostasis or a matter of fat--store 'em up or burn 'em down. *Genetics*, 193(1), 1-50.
- Koliwad, S. K., Gray, N. E., & Wang, J.-C. (2012). Angiopoietin-like 4 (Angptl4): A glucocorticoid-dependent gatekeeper of fatty acid flux during fasting. *Adipocyte*, 1(3), 182-187.
- Kono, H., Fujii, H., Asakawa, M., Maki, A., Amemiya, H., Hirai, Y., Matsuda, M., & Yamamoto, M. (2004). Medium-chain triglycerides enhance secretory IgA expression in rat intestine after administration of endotoxin. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 286(6), G1081-1089.
- Kono, H., Fujii, H., Asakawa, M., Yamamoto, M., Matsuda, M., Maki, A., & Matsumoto, Y. (2003a). Protective effects of medium-chain triglycerides on the liver and gut in rats administered endotoxin. *Ann Surg*, 237(2), 246-255.
- Kono, H., Fujii, H., Asakawa, M., Yamamoto, M., Matsuda, M., Maki, A., & Matsumoto, Y. (2003b). Protective effects of medium-chain triglycerides on the liver and gut in rats administered endotoxin. *Annals of surgery*, 237(2), 246-255.
- Kono, H., Fujii, H., Ishii, K., Hosomura, N., & Ogiku, M. (2010a). Dietary mediumchain triglycerides prevent chemically induced experimental colitis in rats. *Transl Res*, 155(3), 131-141.
- Kono, H., Fujii, H., Ogiku, M., Tsuchiya, M., Ishii, K., & Hara, M. (2010b). Enteral diets enriched with medium-chain triglycerides and N-3 fatty acids prevent chemically induced experimental colitis in rats. *Transl Res*, 156(5), 282-291.
- Korach-Andre, M., & Gustafsson, J. A. (2015). Liver X receptors as regulators of metabolism. *Biomol Concepts*, 6(3), 177-190.
- Kotronen, A., Seppanen-Laakso, T., Westerbacka, J., Kiviluoto, T., Arola, J., Ruskeepaa, A. L., Oresic, M., & Yki-Jarvinen, H. (2009). Hepatic stearoyl-CoA desaturase (SCD)-1 activity and diacylglycerol but not ceramide concentrations are increased in the nonalcoholic human fatty liver. *Diabetes*, 58(1), 203-208.
- Kraemer, F. B., & Shen, W.-J. (2006). Hormone-Sensitive Lipase Knockouts. *Nutrition & Metabolism*, 3(1), 12.
- Kraemer, F. B., & Shen, W. J. (2002). Hormone-sensitive lipase: control of intracellular tri-(di-)acylglycerol and cholesteryl ester hydrolysis. *Journal of lipid research*, 43(10), 1585-1594.

- Krauss, S., Zhang, C.-Y., & Lowell, B. B. (2002). A significant portion of mitochondrial proton leak in intact thymocytes depends on expression of UCP2. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(1), 118-122.
- Kriszt, R., Arai, S., Itoh, H., Lee, M. H., Goralczyk, A. G., Ang, X. M., Cypess, A. M., White, A. P., Shamsi, F., Xue, R., Lee, J. Y., Lee, S.-C., Hou, Y., Kitaguchi, T., Sudhaharan, T., Ishiwata, S. i., Lane, E. B., Chang, Y.-T., Tseng, Y.-H., Suzuki, M., & Raghunath, M. (2017). Optical visualisation of thermogenesis in stimulated single-cell brown adipocytes. *Scientific Reports*, 7(1), 1383.
- Krycer, J. R., Sharpe, L. J., Luu, W., & Brown, A. J. (2010). The Akt-SREBP nexus: cell signaling meets lipid metabolism. *Trends Endocrinol Metab*, 21(5), 268-276.
- Kumari, A. (2018). Chapter 4 Beta Oxidation of Fatty Acids. In A. Kumari (Ed.), *Sweet Biochemistry* (pp. 17-19): Academic Press.
- Kushibiki, T., Okawa, S., Hirasawa, T., & Ishihara, M. (2015). Optogenetic control of insulin secretion by pancreatic beta-cells in vitro and in vivo. *Gene Ther*, 22(7), 553-559.
- Kyrou, I., Randeva, H. S., & Weickert, M. O. (2000 (2014)). Clinical Problems Caused by Obesity. In L. J. De Groot, P. Beck-Peccoz, G. Chrousos, K. Dungan, A. Grossman, J. M. Hershman, C. Koch, R. McLachlan, M. New, R. Rebar, F. Singer, A. Vinik, & M. O. Weickert (Eds.), *Endotext*. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.
- Lambert, J. E., Ramos-Roman, M. A., Browning, J. D., & Parks, E. J. (2014). Increased de novo lipogenesis is a distinct characteristic of individuals with nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology*, 146(3), 726-735.
- Langin, D. (2006). Adipose tissue lipolysis as a metabolic pathway to define pharmacological strategies against obesity and the metabolic syndrome. *Pharmacol Res*, 53(6), 482-491.
- Larter, C. Z., Yeh, M. M., Williams, J., Bell-Anderson, K. S., & Farrell, G. C. (2008). MCD-induced steatohepatitis is associated with hepatic adiponectin resistance and adipogenic transformation of hepatocytes. *J Hepatol*, 49(3), 407-416.
- Lass, A., Zimmermann, R., Haemmerle, G., Riederer, M., Schoiswohl, G., Schweiger, M., Kienesberger, P., Strauss, J. G., Gorkiewicz, G., & Zechner, R. (2006).
 Adipose triglyceride lipase-mediated lipolysis of cellular fat stores is activated by CGI-58 and defective in Chanarin-Dorfman Syndrome. *Cell Metab*, 3(5), 309-319.

- Lass, A., Zimmermann, R., Oberer, M., & Zechner, R. (2011). Lipolysis a highly regulated multi-enzyme complex mediates the catabolism of cellular fat stores. *Progress in lipid research*, 50(1), 14-27.
- Latour, M. G., Alquier, T., Oseid, E., Tremblay, C., Jetton, T. L., Luo, J., Lin, D. C.-H., & Poitout, V. (2007). GPR40 Is Necessary but Not Sufficient for Fatty Acid Stimulation of Insulin Secretion In Vivo. *Diabetes*, 56(4), 1087-1094.
- LeBlanc, J. G., Milani, C., de Giori, G. S., Sesma, F., van Sinderen, D., & Ventura, M. (2013). Bacteria as vitamin suppliers to their host: a gut microbiota perspective. *Curr Opin Biotechnol*, 24(2), 160-168.
- Ledesma, A., de Lacoba, M. G., & Rial, E. (2002). The mitochondrial uncoupling proteins. *Genome biology*, *3*(12), REVIEWS3015-REVIEWS3015.
- Lee, C.-H., Olson, P., & Evans, R. M. (2003). Minireview: Lipid Metabolism, Metabolic Diseases, and Peroxisome Proliferator-Activated Receptors. *Endocrinology*, 144(6), 2201-2207.
- Lee, D. H., Porta, M., Jacobs, D. R., Jr., & Vandenberg, L. N. (2014a). Chlorinated persistent organic pollutants, obesity, and type 2 diabetes. *Endocr Rev*, 35(4), 557-601.
- Lee, J. J., Lambert, J. E., Hovhannisyan, Y., Ramos-Roman, M. A., Trombold, J. R., Wagner, D. A., & Parks, E. J. (2015). Palmitoleic acid is elevated in fatty liver disease and reflects hepatic lipogenesis. *Am J Clin Nutr, 101*(1), 34-43.
- Lee, Y., Hirose, H., Ohneda, M., Johnson, J. H., McGarry, J. D., & Unger, R. H. (1994). Beta-cell lipotoxicity in the pathogenesis of non-insulin-dependent diabetes mellitus of obese rats: impairment in adipocyte-beta-cell relationships. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(23), 10878-10882.
- Lee, Y. Y., Tang, T. K., Ab Karim, N. A., Alitheen, N. B., & Lai, O. M. (2014b). Short term and dosage influences of palm based medium- and long-chain triacylglycerols on body fat and blood parameters in C57BL/6J mice. *Food Funct*, 5(1), 57-64.
- Lefebvre, P. J., & Luyckx, A. S. (1969). Effect of insulin on glucagon enhanced lipolysis in vitro. *Diabetologia*, 5(3), 195-197.
- Lefterova, M. I., Zhang, Y., Steger, D. J., Schupp, M., Schug, J., Cristancho, A., Feng, D., Zhuo, D., Stoeckert, C. J., Jr., Liu, X. S., & Lazar, M. A. (2008).

PPARgamma and C/EBP factors orchestrate adipocyte biology via adjacent binding on a genome-wide scale. *Genes Dev, 22*(21), 2941-2952.

- Lemarie, F., Beauchamp, E., Dayot, S., Duby, C., Legrand, P., & Rioux, V. (2015). Dietary Caprylic Acid (C8:0) Does Not Increase Plasma Acylated Ghrelin but Decreases Plasma Unacylated Ghrelin in the Rat. *PLoS One, 10*(7), e0133600.
- Lemarie, F., Beauchamp, E., Legrand, P., & Rioux, V. (2016). Revisiting the metabolism and physiological functions of caprylic acid (C8:0) with special focus on ghrelin octanoylation. *Biochimie*, *120*, 40-48.
- Lenihan-Geels, G., Bishop, K. S., & Ferguson, L. R. (2013). Alternative sources of omega-3 fats: can we find a sustainable substitute for fish? *Nutrients*, 5(4), 1301-1315.
- Ley, R. E., Backhed, F., Turnbaugh, P., Lozupone, C. A., Knight, R. D., & Gordon, J.
 I. (2005). Obesity alters gut microbial ecology. *Proceedings of the National* Academy of Sciences of the United States of America, 102(31), 11070-11075.
- Lezak, K. R., Missig, G., & Carlezon, W. A., Jr. (2017). Behavioral methods to study anxiety in rodents. *Dialogues in clinical neuroscience*, 19(2), 181-191.
- Li-Beisson, Y., Nakamura, Y., & Harwood, J. (2016). Lipids: From Chemical Structures, Biosynthesis, and Analyses to Industrial Applications. *Subcell Biochem*, *86*, 1-18.
- Li, H., & Yu, X. (2013). Emerging role of JNK in insulin resistance. *Curr Diabetes Rev, 9*(5), 422-428.
- Li, L., Wang, B., Yu, P., Wen, X., Gong, D., & Zeng, Z. (2016a). Medium and Long Chain Fatty Acids Differentially Modulate Apoptosis and Release of Inflammatory Cytokines in Human Liver Cells. *J Food Sci*, 81(6), H1546-1552.
- Li, M., Meng, X., Xu, J., Huang, X., Li, H., Li, G., Wang, S., Man, Y., Tang, W., & Li, J. (2016b). GPR40 agonist ameliorates liver X receptor-induced lipid accumulation in liver by activating AMPK pathway. *Scientific Reports*, 6, 25237-25237.
- Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S. M., Ahmad, M., Alnemri, E. S., & Wang, X. (1997). Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell*, *91*(4), 479-489.

- Li, Y., Hansotia, T., Yusta, B., Ris, F., Halban, P. A., & Drucker, D. J. (2003). Glucagon-like peptide-1 receptor signaling modulates beta cell apoptosis. *J Biol Chem*, 278(1), 471-478.
- Li, Y., Xu, S., Mihaylova, M. M., Zheng, B., Hou, X., Jiang, B., Park, O., Luo, Z., Lefai, E., Shyy, J. Y. J., Gao, B., Wierzbicki, M., Verbeuren, T. J., Shaw, R. J., Cohen, R. A., & Zang, M. (2011). AMPK phosphorylates and inhibits SREBP activity to attenuate hepatic steatosis and atherosclerosis in diet-induced insulin-resistant mice. *Cell Metabolism*, 13(4), 376-388.
- Li, Z., & Diehl, A. M. (2003). Innate immunity in the liver. *Curr Opin Gastroenterol*, 19(6), 565-571.
- Li, Z., Lai, Z. W., Christiano, R., Gazos-Lopes, F., Walther, T. C., & Farese, R. V., Jr. (2018). Global Analyses of Selective Insulin Resistance in Hepatocytes Caused by Palmitate Lipotoxicity. *Mol Cell Proteomics*, 17(5), 836-849.
- Li, Z., Mulholland, M., & Zhang, W. (2016c). Ghrelin O-acyltransferase (GOAT) and energy metabolism. *Sci China Life Sci*, *59*(3), 281-291.
- Li, Z. Z., Berk, M., McIntyre, T. M., & Feldstein, A. E. (2009). Hepatic lipid partitioning and liver damage in nonalcoholic fatty liver disease: role of stearoyl-CoA desaturase. *J Biol Chem*, 284(9), 5637-5644.
- Liberato, M. V., Nascimento, A. S., Ayers, S. D., Lin, J. Z., Cvoro, A., Silveira, R. L., Martinez, L., Souza, P. C., Saidemberg, D., Deng, T., Amato, A. A., Togashi, M., Hsueh, W. A., Phillips, K., Palma, M. S., Neves, F. A., Skaf, M. S., Webb, P., & Polikarpov, I. (2012a). Medium chain fatty acids are selective peroxisome proliferator activated receptor (PPAR) gamma activators and pan-PPAR partial agonists. *PLoS One*, 7(5), e36297.
- Liberato, M. V., Nascimento, A. S., Ayers, S. D., Lin, J. Z., Cvoro, A., Silveira, R. L., Martínez, L., Souza, P. C. T., Saidemberg, D., Deng, T., Amato, A. A., Togashi, M., Hsueh, W. A., Phillips, K., Palma, M. S., Neves, F. A. R., Skaf, M. S., Webb, P., & Polikarpov, I. (2012b). Medium chain fatty acids are selective peroxisome proliferator activated receptor (PPAR) γ activators and pan-PPAR partial agonists. *PLoS One*, 7(5), e36297-e36297.
- Lieber, C. S., Lefevre, A., Spritz, N., Feinman, L., & DeCarli, L. M. (1967). Difference in hepatic metabolism of long- and medium-chain fatty acids: the role of fatty acid chain length in the production of the alcoholic fatty liver. *J Clin Invest*, 46(9), 1451-1460.

- Lim, G. E.-J. (2009). The Effect of Insulin and Insulin Resistance on Glucagon-like Peptide-1 Secretion from the Intestinal L Cell. (Doctorate). University of Toronto,
- Lin, Y. C., Chang, P. F., Lin, H. F., Liu, K., Chang, M. H., & Ni, Y. H. (2016). Variants in the autophagy-related gene IRGM confer susceptibility to non-alcoholic fatty liver disease by modulating lipophagy. *J Hepatol*, 65(6), 1209-1216.
- Ling, P. R., Hamawy, K. J., Moldawer, L. L., Istfan, N., Bistrian, B. R., & Blackburn, G. L. (1986). Evaluation of the protein quality of diets containing medium- and long-chain triglyceride in healthy rats. *J Nutr*, *116*(3), 343-349.
- Listenberger, L. L., Han, X., Lewis, S. E., Cases, S., Farese, R. V., Jr., Ory, D. S., & Schaffer, J. E. (2003a). Triglyceride accumulation protects against fatty acidinduced lipotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(6), 3077-3082.
- Listenberger, L. L., Han, X., Lewis, S. E., Cases, S., Farese, R. V., Ory, D. S., & Schaffer, J. E. (2003b). Triglyceride accumulation protects against fatty acidinduced lipotoxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(6), 3077-3082.
- Liu, H. Y., Hong, T., Wen, G. B., Han, J., Zuo, D., Liu, Z., & Cao, W. (2009). Increased basal level of Akt-dependent insulin signaling may be responsible for the development of insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 297(4), E898-906.
- Liu, R. H., Wharton, S., Sharma, A. M., Ardern, C. I., & Kuk, J. L. (2013a). Influence of a clinical lifestyle-based weight loss program on the metabolic risk profile of metabolically normal and abnormal obese adults. *Obesity (Silver Spring)*, 21(8), 1533-1539.
- Liu, T., Chen, X. M., Sun, J. Y., Jiang, X. S., Wu, Y., Yang, S., Huang, H. Z., Ruan, X. Z., & Du, X. G. (2018a). Palmitic Acid-Induced Podocyte Apoptosis via the Reactive Oxygen Species-Dependent Mitochondrial Pathway. *Kidney Blood Press Res, 43*(1), 206-219.
- Liu, Y. (2015). Fatty acids, inflammation and intestinal health in pigs. J Anim Sci Biotechnol, 6(1), 41.
- Liu, Y., Dong, J., & Ren, B. (2018b). MicroRNA-182-5p contributes to the protective effects of thrombospondin 1 against lipotoxicity in INS-1 cells. *Exp Ther Med, 16*(6), 5272-5279.

- Liu, Y., Zhu, Z. A., Zhang, S. N., Mou, J., Liu, L., Cui, T., & Pei, D. S. (2013b). Combinational effect of PPARgamma agonist and RXR agonist on the growth of SGC7901 gastric carcinoma cells in vitro. *Tumour Biol*, 34(4), 2409-2418.
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25(4), 402-408.
- Lizaso, A., Tan, K. T., & Lee, Y. H. (2013). beta-adrenergic receptor-stimulated lipolysis requires the RAB7-mediated autolysosomal lipid degradation. *Autophagy*, 9(8), 1228-1243.
- Lloyd, A. C., Carpenter, C. A., & Saggerson, E. D. (1986). Intertissue differences in the hysteretic behaviour of carnitine palmitoyltransferase in the presence of malonyl-CoA. *Biochemical Journal*, 237(1), 289-291.
- Lodhi, I. J., Wei, X., & Semenkovich, C. F. (2011). Lipoexpediency: de novo lipogenesis as a metabolic signal transmitter. *Trends Endocrinol Metab*, 22(1), 1-8.
- Long, A. P., Manneschmidt, A. K., VerBrugge, B., Dortch, M. R., Minkin, S. C., Prater, K. E., Biggerstaff, J. P., Dunlap, J. R., & Dalhaimer, P. (2012). Lipid droplet de novo formation and fission are linked to the cell cycle in fission yeast. *Traffic,* 13(5), 705-714.
- Loos, R. J. (2014). Integrating publicly available genome-wide association data to study the genetic basis of metabolically healthy obese and metabolically obese but normal-weight individuals. *Diabetes*, 63(12), 4004-4007.
- Lopez-Delgado, M. I., Morales, M., Villanueva-Penacarrillo, M. L., Malaisse, W. J., & Valverde, I. (1998). Effects of glucagon-like peptide 1 on the kinetics of glycogen synthase a in hepatocytes from normal and diabetic rats. *Endocrinology*, 139(6), 2811-2817.
- Lopez-Vicario, C., Gonzalez-Periz, A., Rius, B., Moran-Salvador, E., Garcia-Alonso, V., Lozano, J. J., Bataller, R., Cofan, M., Kang, J. X., Arroyo, V., Claria, J., & Titos, E. (2014). Molecular interplay between Delta5/Delta6 desaturases and long-chain fatty acids in the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis. *Gut*, 63(2), 344-355.
- Lounis, M. A., Bergeron, K. F., Burhans, M. S., Ntambi, J. M., & Mounier, C. (2017). Oleate activates SREBP-1 signaling activity in SCD1-deficient hepatocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 313(6), E710-e720.

- 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. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1861(11), 1662-1670.
- Lounis, M. A., Rial, S., Ntambi, J. M., & Mounier, C. (2015a). Role of Lipogenesis and Lipid Desaturases in Non-alcoholic Fatty Liver Disease. In J. M. Ntambi (Ed.), *HEPATIC DE NOVO LIPOGENESIS AND REGULATION OF METABOLISM* (pp. 143-164).
- Lounis, M. A., Rial, S., Ntambi, J. M., & Mounier, C. (2015b). Role of Lipogenesis and Lipid Desaturases in Non-alcoholic Fatty Liver Disease. Madison, USA.
- Lu, A. Y., & Coon, M. J. (1968). Role of hemoprotein P-450 in fatty acid omegahydroxylation in a soluble enzyme system from liver microsomes. *J Biol Chem*, 243(6), 1331-1332.
- Ludgero-Correia, A., Aguila, M. B., Mandarim-de-Lacerda, C. A., & Faria, T. S. (2012). Effects of high-fat diet on plasma lipids, adiposity, and inflammatory markers in ovariectomized C57BL/6 mice. *Nutrition*, 28(3), 316-323.
- Luijten, I. H. N., Feldmann, H. M., von Essen, G., Cannon, B., & Nedergaard, J. (2019). In the absence of UCP1-mediated diet-induced thermogenesis, obesity is augmented even in the obesity-resistant 129S mouse strain. *American Journal* of Physiology-Endocrinology and Metabolism, 316(5), E729-E740.
- Luiken, J. J. F. P., Chanda, D., Nabben, M., Neumann, D., & Glatz, J. F. C. (2016). Post-translational modifications of CD36 (SR-B2): Implications for regulation of myocellular fatty acid uptake. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) -Molecular Basis of Disease, 1862*(12), 2253-2258.
- Ma, S. W., Nadeau, B. E., & Foster, D. O. (1987). Evidence for liver as the major site of the diet-induced thermogenesis of rats fed a "cafeteria" diet. *Can J Physiol Pharmacol*, 65(8), 1802-1804.
- Maachi, M., Pieroni, L., Bruckert, E., Jardel, C., Fellahi, S., Hainque, B., Capeau, J., & Bastard, J. P. (2004). Systemic low-grade inflammation is related to both circulating and adipose tissue TNFalpha, leptin and IL-6 levels in obese women. *Int J Obes Relat Metab Disord, 28*(8), 993-997.
- MacDonald, P. E., El-kholy, W., Riedel, M. J., Salapatek, A. M. F., Light, P. E., & Wheeler, M. B. (2002). The Multiple Actions of GLP-1 on the Process of Glucose-Stimulated Insulin Secretion. *Diabetes*, *51*(suppl 3), S434-S442.

- Machado, M. V., & Cortez-Pinto, H. (2014). Non-alcoholic fatty liver disease: What the clinician needs to know. *World Journal of Gastroenterology : WJG*, 20(36), 12956-12980.
- Madsen, M. S., Siersbæk, R., Boergesen, M., Nielsen, R., & Mandrup, S. (2014). Peroxisome proliferator-activated receptor γ and C/EBP α synergistically activate key metabolic adipocyte genes by assisted loading. *Molecular and cellular biology*, 34(6), 939-954.
- Maedler, K., Spinas, G. A., Dyntar, D., Moritz, W., Kaiser, N., & Donath, M. Y. (2001). Distinct Effects of Saturated and Monounsaturated Fatty Acids on β-Cell Turnover and Function. *Diabetes*, 50(1), 69-76.
- Magadum, A., Ding, Y., He, L., Kim, T., Vasudevarao, M. D., Long, Q., Yang, K., Wickramasinghe, N., Renikunta, H. V., Dubois, N., Weidinger, G., Yang, Q., & Engel, F. B. (2017). Live cell screening platform identifies PPARδ as a regulator of cardiomyocyte proliferation and cardiac repair. *Cell research*, 27(8), 1002-1019.
- Malapaka, R. R., Khoo, S., Zhang, J., Choi, J. H., Zhou, X. E., Xu, Y., Gong, Y., Li, J., Yong, E. L., Chalmers, M. J., Chang, L., Resau, J. H., Griffin, P. R., Chen, Y. E., & Xu, H. E. (2012). Identification and mechanism of 10-carbon fatty acid as modulating ligand of peroxisome proliferator-activated receptors. J Biol Chem, 287(1), 183-195.
- Malhi, H., Barreyro, F. J., Isomoto, H., Bronk, S. F., & Gores, G. J. (2007). Free fatty acids sensitise hepatocytes to TRAIL mediated cytotoxicity. *Gut*, *56*(8), 1124-1131.
- Malhi, H., & Gores, G. J. (2008). Molecular mechanisms of lipotoxicity in nonalcoholic fatty liver disease. *Semin Liver Dis*, 28(4), 360-369.
- Mansour, D., & McPherson, S. (2018). Management of decompensated cirrhosis. *Clinical medicine (London, England), 18*(Suppl 2), s60-s65.
- Mao, J., DeMayo, F. J., Li, H., Abu-Elheiga, L., Gu, Z., Shaikenov, T. E., Kordari, P., Chirala, S. S., Heird, W. C., & Wakil, S. J. (2006a). Liver-specific deletion of acetyl-CoA carboxylase 1 reduces hepatic triglyceride accumulation without affecting glucose homeostasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(22), 8552-8557.
- Mao, X., Kikani, C. K., Riojas, R. A., Langlais, P., Wang, L., Ramos, F. J., Fang, Q., Christ-Roberts, C. Y., Hong, J. Y., Kim, R. Y., Liu, F., & Dong, L. Q. (2006b).

APPL1 binds to adiponectin receptors and mediates adiponectin signalling and function. *Nat Cell Biol*, 8(5), 516-523.

- Mar Rodriguez, M., Perez, D., Javier Chaves, F., Esteve, E., Marin-Garcia, P., Xifra, G., Vendrell, J., Jove, M., Pamplona, R., Ricart, W., Portero-Otin, M., Chacon, M. R., & Fernandez Real, J. M. (2015). Obesity changes the human gut mycobiome. *Sci Rep*, *5*, 14600.
- Marinou, K., Hodson, L., Vasan, S. K., Fielding, B. A., Banerjee, R., Brismar, K., Koutsilieris, M., Clark, A., Neville, M. J., & Karpe, F. (2014). Structural and functional properties of deep abdominal subcutaneous adipose tissue explain its association with insulin resistance and cardiovascular risk in men. *Diabetes Care*, 37(3), 821-829.
- Marinovic, M. P., Campeiro, J. D., Lima, S. C., Rocha, A. L., Nering, M. B., Oliveira, E. B., Mori, M. A., & Hayashi, M. A. F. (2018). Crotamine induces browning of adipose tissue and increases energy expenditure in mice. *Sci Rep*, 8(1), 5057.
- Marion-Letellier, R., Savoye, G., & Ghosh, S. (2016). Fatty acids, eicosanoids and PPAR gamma. *European journal of pharmacology*, 785, 44-49.
- Maron, D. F., Smith, T. J. S., & Nachman, K. E. (2013). Restrictions on antimicrobial use in food animal production: an international regulatory and economic survey. *Globalization and Health*, *9*, 48-48.
- Marsin, A. S., Bertrand, L., Rider, M. H., Deprez, J., Beauloye, C., Vincent, M. F., Van den Berghe, G., Carling, D., & Hue, L. (2000). Phosphorylation and activation of heart PFK-2 by AMPK has a role in the stimulation of glycolysis during ischaemia. *Curr Biol*, 10(20), 1247-1255.
- Marsin, A. S., Bouzin, C., Bertrand, L., & Hue, L. (2002). The stimulation of glycolysis by hypoxia in activated monocytes is mediated by AMP-activated protein kinase and inducible 6-phosphofructo-2-kinase. *J Biol Chem*, 277(34), 30778-30783.
- Marten, B., Pfeuffer, M., & Schrezenmeir, J. (2006). Medium-chain triglycerides. *International Dairy Journal, 16*(11), 1374-1382.
- Martin, S., & Parton, R. G. (2006). Lipid droplets: a unified view of a dynamic organelle. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 7(5), 373-378.
- Mashek, D. G., Li, L. O., & Coleman, R. A. (2007). Long-chain acyl-CoA synthetases and fatty acid channeling. *Future lipidology*, 2(4), 465-476.

- Masuno, H., Schultz, C. J., Park, J. W., Blanchette-Mackie, E. J., Mateo, C., & Scow,
 R. O. (1991). Glycosylation, activity and secretion of lipoprotein lipase in cultured brown adipocytes of newborn mice. Effect of tunicamycin, monensin, 1-deoxymannojirimycin and swainsonine. *Biochem J*, 277 (*Pt 3*), 801-809.
- Matoba, A., Matsuyama, N., Shibata, S., Masaki, E., Sr., C. W. E., & Mizuta, K. (2018). The free fatty acid receptor 1 promotes airway smooth muscle cell proliferation through MEK/ERK and PI3K/Akt signaling pathways. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 314(3), L333-L348.
- Matsha, T. E., Ismail, S., Speelman, A., Hon, G. M., Davids, S., Erasmus, R. T., & Kengne, A. P. (2019). Visceral and subcutaneous adipose tissue association with metabolic syndrome and its components in a South African population. *Clin Nutr ESPEN*, 32, 76-81.
- Matsuo, T., Matsuo, M., Kasai, M., & Takeuchi, H. (2001). Effects of a liquid diet supplement containing structured medium- and long-chain triacylglycerols on bodyfat accumulation in healthy young subjects. *Asia Pac J Clin Nutr, 10*(1), 46-50.
- Matsusue, K., Kusakabe, T., Noguchi, T., Takiguchi, S., Suzuki, T., Yamano, S., & Gonzalez, F. J. (2008). Hepatic steatosis in leptin-deficient mice is promoted by the PPARgamma target gene Fsp27. *Cell Metab*, 7(4), 302-311.
- Matsuzaka, T., Atsumi, A., Matsumori, R., Nie, T., Shinozaki, H., Suzuki-Kemuriyama, N., Kuba, M., Nakagawa, Y., Ishii, K., Shimada, M., Kobayashi, K., Yatoh, S., Takahashi, A., Takekoshi, K., Sone, H., Yahagi, N., Suzuki, H., Murata, S., Nakamuta, M., Yamada, N., & Shimano, H. (2012). Elovl6 promotes nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*, 56(6), 2199-2208.
- Matsuzaka, T., & Shimano, H. (2011). Molecular mechanisms involved in hepatic steatosis and insulin resistance. *J Diabetes Investig*, 2(3), 170-175.
- Mauriege, P., Joanisse, D. R., Cartier, A., Lemieux, I., Bergeron, J., Biron, S., Marceau, P., & 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.
- Mauvoisin, D., & Mounier, C. (2011). Hormonal and nutritional regulation of SCD1 gene expression. *Biochimie*, 93(1), 78-86.
- Mayer, C. M., & Belsham, D. D. (2010). Palmitate attenuates insulin signaling and induces endoplasmic reticulum stress and apoptosis in hypothalamic neurons:

rescue of resistance and apoptosis through adenosine 5' monophosphateactivated protein kinase activation. *Endocrinology*, 151(2), 576-585.

- Mazure, N. M. (2016). News about VDAC1 in Hypoxia. *Frontiers in oncology, 6*, 193-193.
- McAllister, E. J., Dhurandhar, N. V., Keith, S. W., Aronne, L. J., Barger, J., Baskin, M., Benca, R. M., Biggio, J., Boggiano, M. M., Eisenmann, J. C., Elobeid, M., Fontaine, K. R., Gluckman, P., Hanlon, E. C., Katzmarzyk, P., Pietrobelli, A., Redden, D. T., Ruden, D. M., Wang, C., Waterland, R. A., Wright, S. M., & Allison, D. B. (2009). Ten putative contributors to the obesity epidemic. *Crit Rev Food Sci Nutr, 49*(10), 868-913.
- McCarty, M. F., & DiNicolantonio, J. J. (2016). Lauric acid-rich medium-chain triglycerides can substitute for other oils in cooking applications and may have limited pathogenicity. *Open heart*, 3(2), e000467-e000467.
- McGee, S. L., van Denderen, B. J., Howlett, K. F., Mollica, J., Schertzer, J. D., Kemp, B. E., & Hargreaves, M. (2008). AMP-activated protein kinase regulates GLUT4 transcription by phosphorylating histone deacetylase 5. *Diabetes*, 57(4), 860-867.
- McGuire, M. T., Wing, R. R., & Hill, J. O. (1999). The prevalence of weight loss maintenance among American adults. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 23(12), 1314-1319.
- McLaughlin, T., Abbasi, F., Lamendola, C., Liang, L., Reaven, G., Schaaf, P., & Reaven, P. (2002). Differentiation between obesity and insulin resistance in the association with C-reactive protein. *Circulation*, 106(23), 2908-2912.
- Membrez, M., Blancher, F., Jaquet, M., Bibiloni, R., Cani, P. D., Burcelin, R. G., Corthesy, I., Mace, K., & Chou, C. J. (2008). Gut microbiota modulation with norfloxacin and ampicillin enhances glucose tolerance in mice. *Faseb j*, 22(7), 2416-2426.
- Mena, S. J., Manosalva, C., Carretta, M. D., Teuber, S., Olmo, I., Burgos, R. A., & Hidalgo, M. A. (2016). Differential free fatty acid receptor-1 (FFAR1/GPR40) signalling is associated with gene expression or gelatinase granule release in bovine neutrophils. *Innate Immun*, 22(6), 479-489.
- Merglen, A., Theander, S., Rubi, B., Chaffard, G., Wollheim, C. B., & Maechler, P. (2004). Glucose sensitivity and metabolism-secretion coupling studied during two-year continuous culture in INS-1E insulinoma cells. *Endocrinology*, 145(2), 667-678.

- Milic, S., & Stimac, D. (2012). Nonalcoholic fatty liver disease/steatohepatitis: epidemiology, pathogenesis, clinical presentation and treatment. *Dig Dis, 30*(2), 158-162.
- Miller, T. A., LeBrasseur, N. K., Cote, G. M., Trucillo, M. P., Pimentel, D. R., Ido, Y., Ruderman, N. B., & Sawyer, D. B. (2005). Oleate prevents palmitate-induced cytotoxic stress in cardiac myocytes. *Biochem Biophys Res Commun, 336*(1), 309-315.
- Minokoshi, Y., Kim, Y. B., Peroni, O. D., Fryer, L. G., Muller, C., Carling, D., & Kahn, B. B. (2002). Leptin stimulates fatty-acid oxidation by activating AMPactivated protein kinase. *Nature*, 415(6869), 339-343.
- Misra, P., Viswakarma, N., & Reddy, J. (2013). Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-α Signaling in Hepatocarcinogenesis. *Sub-cellular biochemistry*, 69, 77-99.
- Miyamoto, J., Hasegawa, S., Kasubuchi, M., Ichimura, A., Nakajima, A., & Kimura, I. (2016). Nutritional Signaling via Free Fatty Acid Receptors. *International journal of molecular sciences*, 17(4), 450-450.
- Miyazaki, M., Dobrzyn, A., Man, W. C., Chu, K., Sampath, H., Kim, H. J., & Ntambi, J. M. (2004). Stearoyl-CoA desaturase 1 gene expression is necessary for fructose-mediated induction of lipogenic gene expression by sterol regulatory element-binding protein-1c-dependent and -independent mechanisms. J Biol Chem, 279(24), 25164-25171.
- Miyazaki, M., Flowers, M. T., Sampath, H., Chu, K., Otzelberger, C., Liu, X., & Ntambi, J. M. (2007). Hepatic stearoyl-CoA desaturase-1 deficiency protects mice from carbohydrate-induced adiposity and hepatic steatosis. *Cell Metab*, 6(6), 484-496.
- Miyazaki, M., Kim, Y. C., Gray-Keller, M. P., Attie, A. D., & Ntambi, J. M. (2000). The biosynthesis of hepatic cholesterol esters and triglycerides is impaired in mice with a disruption of the gene for stearoyl-CoA desaturase 1. *J Biol Chem*, 275(39), 30132-30138.
- Miyazaki, M., Kim, Y. C., & Ntambi, J. M. (2001). A lipogenic diet in mice with a disruption of the stearoyl-CoA desaturase 1 gene reveals a stringent requirement of endogenous monounsaturated fatty acids for triglyceride synthesis. *Journal of lipid research*, 42(7), 1018-1024.
- Monteiro, J., Leslie, M., Moghadasian, M. H., Arendt, B. M., Allard, J. P., & Ma, D. W. (2014). The role of n 6 and n 3 polyunsaturated fatty acids in the

manifestation of the metabolic syndrome in cardiovascular disease and nonalcoholic fatty liver disease. *Food Funct*, 5(3), 426-435.

- Montgomery, M. K., Osborne, B., Brown, S. H., Small, L., Mitchell, T. W., Cooney, G. J., & Turner, N. (2013). Contrasting metabolic effects of medium- versus long-chain fatty acids in skeletal muscle. *Journal of lipid research*, 54(12), 3322-3333.
- Moon, Y. A., Ochoa, C. R., Mitsche, M. A., Hammer, R. E., & Horton, J. D. (2014). Deletion of ELOVL6 blocks the synthesis of oleic acid but does not prevent the development of fatty liver or insulin resistance. *Journal of lipid research*, 55(12), 2597-2605.
- Moon, Y. A., Shah, N. A., Mohapatra, S., Warrington, J. A., & Horton, J. D. (2001). Identification of a mammalian long chain fatty acyl elongase regulated by sterol regulatory element-binding proteins. *J Biol Chem*, 276(48), 45358-45366.
- Moore, J. B., Gunn, P. J., & Fielding, B. A. (2014). The role of dietary sugars and de novo lipogenesis in non-alcoholic fatty liver disease. *Nutrients*, *6*(12), 5679-5703.
- Moravcova, A., Cervinkova, Z., Kucera, O., Mezera, V., Rychtrmoc, D., & Lotkova, H. (2015). The effect of oleic and palmitic acid on induction of steatosis and cytotoxicity on rat hepatocytes in primary culture. *Physiol Res, 64 Suppl 5*, S627-636.
- Mori, M., Nakagami, H., Rodriguez-Araujo, G., Nimura, K., & Kaneda, Y. (2012). Essential role for miR-196a in brown adipogenesis of white fat progenitor cells. *PLoS Biol, 10*(4), e1001314.
- Mori, N., Nakanishi, S., Shiomi, S., Kiyokawa, S., Kakimoto, S., Nakagawa, K., Hosoe, K., Minami, K., & Nadamoto, T. (2015). Enhancement of Fat Oxidation by Licorice Flavonoid Oil in Healthy Humans during Light Exercise. J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo), 61(5), 406-416.
- Morrison, S. F., Madden, C. J., & Tupone, D. (2012). Central control of brown adipose tissue thermogenesis. *Front Endocrinol (Lausanne)*, *3*(5).
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*, 65(1-2), 55-63.
- Motomura, W., Inoue, M., Ohtake, T., Takahashi, N., Nagamine, M., Tanno, S., Kohgo, Y., & Okumura, T. (2006). Up-regulation of ADRP in fatty liver in human and

liver steatosis in mice fed with high fat diet. *Biochem Biophys Res Commun,* 340(4), 1111-1118.

- Mounier, C., Bouraoui, L., & Rassart, E. (2014). Lipogenesis in cancer progression (review). Int J Oncol, 45(2), 485-492.
- Mugabo, Y., Zhao, S., Lamontagne, J., Al-Mass, A., Peyot, M.-L., Corkey, B. E., Joly, E., Madiraju, S. R. M., & Prentki, M. (2017). Metabolic fate of glucose and candidate signaling and excess-fuel detoxification pathways in pancreatic βcells. *The Journal of biological chemistry*, 292(18), 7407-7422.
- Mumme, K., & Stonehouse, W. (2015). Effects of medium-chain triglycerides on weight loss and body composition: a meta-analysis of randomized controlled trials. J Acad Nutr Diet, 115(2), 249-263.
- Muoio, D. M., Seefeld, K., Witters, L. A., & Coleman, R. A. (1999). AMP-activated kinase reciprocally regulates triacylglycerol synthesis and fatty acid oxidation in liver and muscle: evidence that sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase is a novel target. *The Biochemical journal*, 338 (*Pt 3*)(Pt 3), 783-791.
- Musso, G., Gambino, R., Cassader, M., & Pagano, G. (2011). Meta-analysis: natural history of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and diagnostic accuracy of non-invasive tests for liver disease severity. *Ann Med*, *43*(8), 617-649.
- Nagao, K., & Yanagita, T. (2008). Bioactive lipids in metabolic syndrome. *Progress in lipid research, 47*(2), 127-146.
- Nagao, K., & Yanagita, T. (2010). Medium-chain fatty acids: functional lipids for the prevention and treatment of the metabolic syndrome. *Pharmacol Res, 61*(3), 208-212.
- Nagasaki, H., Kondo, T., Fuchigami, M., Hashimoto, H., Sugimura, Y., Ozaki, N., Arima, H., Ota, A., Oiso, Y., & Hamada, Y. (2012). Inflammatory changes in adipose tissue enhance expression of GPR84, a medium-chain fatty acid receptor. *FEBS Letters*, 586(4), 368-372.
- Nagata, J., Kasai, M., Negishi, S., & Saito, M. (2004). Effects of structured lipids containing eicosapentaenoic or docosahexaenoic acid and caprylic acid on serum and liver lipid profiles in rats. *Biofactors*, 22(1-4), 157-160.
- Nagata, J., Kasai, M., Watanabe, S., Ikeda, I., & Saito, M. (2003). Effects of highly purified structured lipids containing medium-chain fatty acids and linoleic acid on lipid profiles in rats. *Biosci Biotechnol Biochem*, *67*(9), 1937-1943.

- Nagaya, T., Tanaka, N., Suzuki, T., Sano, K., Horiuchi, A., Komatsu, M., Nakajima, T., Nishizawa, T., Joshita, S., Umemura, T., Ichijo, T., Matsumoto, A., Yoshizawa, K., Nakayama, J., Tanaka, E., & Aoyama, T. (2010). Downregulation of SREBP-1c is associated with the development of burned-out NASH. J Hepatol, 53(4), 724-731.
- Nagy, A. (2000). Cre recombinase: The universal reagent for genome tailoring. *Genesis*, 26(2), 99-109.
- Nakamura, M. T., & Nara, T. Y. (2004). Structure, function, and dietary regulation of delta6, delta5, and delta9 desaturases. *Annual review of nutrition, 24*, 345-376.
- Narumiya, S., Sugimoto, Y., & Ushikubi, F. (1999). Prostanoid receptors: structures, properties, and functions. *Physiol Rev*, 79(4), 1193-1226.
- Nassir, F., Rector, R. S., Hammoud, G. M., & Ibdah, J. A. (2015). Pathogenesis and Prevention of Hepatic Steatosis. *Gastroenterology & hepatology*, 11(3), 167-175.
- Neuschwander-Tetri, B. A. (2010). Hepatic lipotoxicity and the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis: the central role of nontriglyceride fatty acid metabolites. *Hepatology*, *52*(2), 774-788.
- Neuschwander-Tetri, B. A., & Caldwell, S. H. (2003). Nonalcoholic steatohepatitis: summary of an AASLD Single Topic Conference. *Hepatology*, *37*(5), 1202-1219.
- Neyrinck, A. M., Van Hee, V. F., Piront, N., De Backer, F., Toussaint, O., Cani, P. D., & Delzenne, N. M. (2012). Wheat-derived arabinoxylan oligosaccharides with prebiotic effect increase satietogenic gut peptides and reduce metabolic endotoxemia in diet-induced obese mice. *Nutr Diabetes, 2*, e28.
- Ng, M., Fleming, T., Robinson, M., Thomson, B., Graetz, N., Margono, C., Mullany, E. C., Biryukov, S., Abbafati, C., Abera, S. F., Abraham, J. P., Abu-Rmeileh, N. M., Achoki, T., AlBuhairan, F. S., Alemu, Z. A., Alfonso, R., Ali, M. K., Ali, R., Guzman, N. A., Ammar, W., Anwari, P., Banerjee, A., Barquera, S., Basu, S., Bennett, D. A., Bhutta, Z., Blore, J., Cabral, N., Nonato, I. C., Chang, J. C., Chowdhury, R., Courville, K. J., Criqui, M. H., Cundiff, D. K., Dabhadkar, K. C., Dandona, L., Davis, A., Dayama, A., Dharmaratne, S. D., Ding, E. L., Durrani, A. M., Esteghamati, A., Farzadfar, F., Fay, D. F., Feigin, V. L., Flaxman, A., Forouzanfar, M. H., Goto, A., Green, M. A., Gupta, R., Hafezi-Nejad, N., Hankey, G. J., Harewood, H. C., Havmoeller, R., Hay, S., Hernandez, L., Husseini, A., Idrisov, B. T., Ikeda, N., Islami, F., Jahangir, E., Jassal, S. K., Jee, S. H., Jeffreys, M., Jonas, J. B., Kabagambe, E. K., Khalifa, S. E., Kengne,

A. P., Khader, Y. S., Khang, Y. H., Kim, D., Kimokoti, R. W., Kinge, J. M., Kokubo, Y., Kosen, S., Kwan, G., Lai, T., Leinsalu, M., Li, Y., Liang, X., Liu, S., Logroscino, G., Lotufo, P. A., Lu, Y., Ma, J., Mainoo, N. K., Mensah, G. A., Merriman, T. R., Mokdad, A. H., Moschandreas, J., Naghavi, M., Naheed, A., Nand, D., Narayan, K. M., Nelson, E. L., Neuhouser, M. L., Nisar, M. I., Ohkubo, T., Oti, S. O., Pedroza, A., Prabhakaran, D., Roy, N., Sampson, U., Seo, H., Sepanlou, S. G., Shibuya, K., Shiri, R., Shiue, I., Singh, G. M., Singh, J. A., Skirbekk, V., Stapelberg, N. J., Sturua, L., Sykes, B. L., Tobias, M., Tran, B. X., Trasande, L., Toyoshima, H., van de Vijver, S., Vasankari, T. J., Veerman, J. L., Velasquez-Melendez, G., Vlassov, V. V., Vollset, S. E., Vos, T., Wang, C., Wang, X., Weiderpass, E., Werdecker, A., Wright, J. L., Yang, Y. C., Yatsuya, H., Yoon, J., Yoon, S. J., Zhao, Y., Zhou, M., Zhu, S., Lopez, A. D., Murray, C. J., & 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. Lancet, 384(9945), 766-781.

- Nguyen, G. T., Green, E. R., & Mecsas, J. (2017). Neutrophils to the ROScue: Mechanisms of NADPH Oxidase Activation and Bacterial Resistance. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 7, 373-373.
- Nguyen, K. D., Qiu, Y., Cui, X., Goh, Y. P. S., Mwangi, J., David, T., Mukundan, L., Brombacher, F., Locksley, R. M., & Chawla, A. (2011). Alternatively activated macrophages produce catecholamines to sustain adaptive thermogenesis. *Nature*, 480(7375), 104-108.
- Niculite, C.-M., Enciu, A.-M., & Hinescu, M. E. (2019). CD 36: Focus on Epigenetic and Post-Transcriptional Regulation. *Frontiers in genetics*, 10, 680-680.
- Niranjan, S. B., Belwalkar, S. V., Tambe, S., Venkataraman, K., & Mookhtiar, K. A. (2019). Recombinant irisin induces weight loss in high fat DIO mice through increase in energy consumption and thermogenesis. *Biochem Biophys Res Commun*, 519(2), 422-429.
- Nirengi, S., Homma, T., Inoue, N., Sato, H., Yoneshiro, T., Matsushita, M., Kameya, T., Sugie, H., Tsuzaki, K., Saito, M., Sakane, N., Kurosawa, Y., & Hamaoka, T. (2016). Assessment of human brown adipose tissue density during daily ingestion of thermogenic capsinoids using near-infrared time-resolved spectroscopy. J Biomed Opt, 21(9), 091305.
- Nobili, V., Alisi, A., Della Corte, C., Rise, P., Galli, C., Agostoni, C., & Bedogni, G. (2013). Docosahexaenoic acid for the treatment of fatty liver: randomised controlled trial in children. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 23(11), 1066-1070.

- Noda, T. (2017). Regulation of Autophagy through TORC1 and mTORC1. *Biomolecules*, 7(3).
- Noguchi, O., Takeuchi, H., Kubota, F., Tsuji, H., & Aoyama, T. (2002). Larger dietinduced thermogenesis and less body fat accumulation in rats fed mediumchain triacylglycerols than in those fed long-chain triacylglycerols. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo), 48*(6), 524-529.
- Nosaka, N., Suzuki, Y., Nagatoishi, A., Kasai, M., Wu, J., & Taguchi, M. (2009). Effect of ingestion of medium-chain triacylglycerols on moderate- and high-intensity exercise in recreational athletes. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*, 55(2), 120-125.
- Nosaka, N., Suzuki, Y., Suemitsu, H., Kasai, M., Kato, K., & Taguchi, M. (2018). Medium-chain Triglycerides with Maltodextrin Increase Fat Oxidation during Moderate-intensity Exercise and Extend the Duration of Subsequent Highintensity Exercise. J Oleo Sci, 67(11), 1455-1462.
- Nova, E., Perez de Heredia, F., Gomez-Martinez, S., & Marcos, A. (2016). The Role of Probiotics on the Microbiota: Effect on Obesity. *Nutr Clin Pract*.
- Ntambi, J. M., Miyazaki, M., Stoehr, J. P., Lan, H., Kendziorski, C. M., Yandell, B. S., Song, Y., Cohen, P., Friedman, J. M., & Attie, A. D. (2002). Loss of stearoyl-CoA desaturase-1 function protects mice against adiposity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(17), 11482-11486.
- Nye, C. K., Hanson, R. W., & Kalhan, S. C. (2008). Glyceroneogenesis is the dominant pathway for triglyceride glycerol synthesis in vivo in the rat. *J Biol Chem*, 283(41), 27565-27574.
- Odegaard, J. I., Ricardo-Gonzalez, R. R., Red Eagle, A., Vats, D., Morel, C. R., Goforth, M. H., Subramanian, V., Mukundan, L., Ferrante, A. W., & Chawla, A. (2008). Alternative M2 activation of Kupffer cells by PPARdelta ameliorates obesityinduced insulin resistance. *Cell Metab*, 7(6), 496-507.
- Ofosu, A., Ramai, D., & Reddy, M. (2018). Non-alcoholic fatty liver disease: controlling an emerging epidemic, challenges, and future directions. *Ann Gastroenterol*, 31(3), 288-295.
- Oh, D. Y., Talukdar, S., Bae, E. J., Imamura, T., Morinaga, H., Fan, W., Li, P., Lu, W. J., Watkins, S. M., & Olefsky, J. M. (2010). GPR120 is an omega-3 fatty acid receptor mediating potent anti-inflammatory and insulin-sensitizing effects. *Cell*, 142(5), 687-698.

- Oh, Y. S., Bae, G. D., Baek, D. J., Park, E.-Y., & Jun, H.-S. (2018). Fatty Acid-Induced Lipotoxicity in Pancreatic Beta-Cells During Development of Type 2 Diabetes. *Frontiers in Endocrinology*, *9*, 384-384.
- Ohno, H., Shinoda, K., Spiegelman, B. M., & Kajimura, S. (2012). PPARgamma agonists induce a white-to-brown fat conversion through stabilization of PRDM16 protein. *Cell Metab*, 15(3), 395-404.
- Ohue-Kitano, R., Yasuoka, Y., Goto, T., Kitamura, N., Park, S.-B., Kishino, S., Kimura, I., Kasubuchi, M., Takahashi, H., Li, Y., Yeh, Y.-S., Jheng, H.-F., Iwase, M., Tanaka, M., Masuda, S., Inoue, T., Yamakage, H., Kusakabe, T., Tani, F., Shimatsu, A., Takahashi, N., Ogawa, J., Satoh-Asahara, N., & Kawada, T. (2018). α-Linolenic acid–derived metabolites from gut lactic acid bacteria induce differentiation of anti-inflammatory M2 macrophages through G protein-coupled receptor 40. *The FASEB Journal*, 32(1), 304-318.
- Okamoto, S., Murano, T., Suzuki, T., Uematsu, S., Niwa, Y., Sasazawa, Y., Dohmae, N., Bujo, H., & Simizu, S. (2017). Regulation of secretion and enzymatic activity of lipoprotein lipase by C-mannosylation. *Biochem Biophys Res Commun, 486*(2), 558-563.
- Okuno, A., Tamemoto, H., Tobe, K., Ueki, K., Mori, Y., Iwamoto, K., Umesono, K., Akanuma, Y., Fujiwara, T., Horikoshi, H., Yazaki, Y., & Kadowaki, T. (1998). Troglitazone increases the number of small adipocytes without the change of white adipose tissue mass in obese Zucker rats. J Clin Invest, 101(6), 1354-1361.
- Ouellet, V., Labbé, S. M., Blondin, D. P., Phoenix, S., Guérin, B., Haman, F., Turcotte, E. E., Richard, D., & 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.
- Oussaada, S. M., van Galen, K. A., Cooiman, M. I., Kleinendorst, L., Hazebroek, E. J., van Haelst, M. M., Ter Horst, K. W., & Serlie, M. J. (2019). The pathogenesis of obesity. *Metabolism*, 92, 26-36.
- Ozgen, H., Baron, W., Hoekstra, D., & Kahya, N. (2016). Oligodendroglial membrane dynamics in relation to myelin biogenesis. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 73(17), 3291-3310.
- Pankowicz, F. P., Barzi, M., Kim, K. H., Legras, X., Martins, C. S., Wooton-Kee, C.
 R., Lagor, W. R., Marini, J. C., Elsea, S. H., Bissig-Choisat, B., Moore, D. D.,
 & Bissig, K.-D. (2018). Rapid Disruption of Genes Specifically in Livers of

Mice Using Multiplex CRISPR/Cas9 Editing. *Gastroenterology*, 155(6), 1967-1970.e1966.

- Papa, S., Martino, P. L., Capitanio, G., Gaballo, A., De Rasmo, D., Signorile, A., & Petruzzella, V. (2012). The oxidative phosphorylation system in mammalian mitochondria. *Adv Exp Med Biol*, 942, 3-37.
- Papamandjaris, A. A., MacDougall, D. E., & Jones, P. J. (1998). Medium chain fatty acid metabolism and energy expenditure: obesity treatment implications. *Life Sci*, *62*(14), 1203-1215.
- Papavassilis, C., Mach, K. K., & Mayser, P. A. (1999). Medium-chain triglycerides inhibit growth of Malassezia: implications for prevention of systemic infection. *Crit Care Med*, 27(9), 1781-1786.
- Park, M. J., Kim, D. I., Choi, J. H., Heo, Y. R., & Park, S. H. (2015). New role of irisin in hepatocytes: The protective effect of hepatic steatosis in vitro. *Cell Signal*, 27(9), 1831-1839.
- Patterson, E., Ryan, P. M., Cryan, J. F., Dinan, T. G., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., & Stanton, C. (2016). Gut microbiota, obesity and diabetes. *Postgrad Med J*.
- Pawlak, M., Lefebvre, P., & Staels, B. (2015). Molecular mechanism of PPARα action and its impact on lipid metabolism, inflammation and fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of Hepatology*, *62*(3), 720-733.
- Payab, M., Amoli, M. M., Qorbani, M., & Hasani-Ranjbar, S. (2016). Adiponectin gene variants and abdominal obesity in an Iranian population. *Eat Weight Disord*.
- Pereira, S. S., & Alvarez-Leite, J. I. (2014). Low-Grade Inflammation, Obesity, and Diabetes. *Curr Obes Rep*, 3(4), 422-431.
- Perelman, A., Wachtel, C., Cohen, M., Haupt, S., Shapiro, H., & Tzur, A. (2012). JC1: alternative excitation wavelengths facilitate mitochondrial membrane potential cytometry. *Cell Death & Disease*, 3(11), e430.
- Perez-Martinez, P., Perez-Jimenez, F., & Lopez-Miranda, J. (2010). n-3 PUFA and lipotoxicity. *Biochimica et biophysica acta, 1801*(3), 362-366.
- Peter, A., Cegan, A., Wagner, S., Elcnerova, M., Konigsrainer, A., Konigsrainer, I., Haring, H. U., Schleicher, E. D., & Stefan, N. (2011). Relationships between hepatic stearoyl-CoA desaturase-1 activity and mRNA expression with liver fat content in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 300(2), E321-326.

- Petersen, M. C., & Shulman, G. I. (2018). Mechanisms of Insulin Action and Insulin Resistance. *Physiological Reviews*, *98*(4), 2133-2223.
- Petersson, H., Arnlov, J., Zethelius, B., & Riserus, U. (2010). Serum fatty acid composition and insulin resistance are independently associated with liver fat markers in elderly men. *Diabetes Res Clin Pract*, 87(3), 379-384.
- Pettinelli, P., Del Pozo, T., Araya, J., Rodrigo, R., Araya, A. V., Smok, G., Csendes, A., Gutierrez, L., Rojas, J., Korn, O., Maluenda, F., Diaz, J. C., Rencoret, G., Braghetto, I., Castillo, J., Poniachik, J., & Videla, L. A. (2009). Enhancement in liver SREBP-1c/PPAR-alpha ratio and steatosis in obese patients: correlations with insulin resistance and n-3 long-chain polyunsaturated fatty acid depletion. *Biochimica et biophysica acta*, 1792(11), 1080-1086.
- Picardo, M., Ottaviani, M., Camera, E., & Mastrofrancesco, A. (2009). Sebaceous gland lipids. *Dermato-endocrinology*, 1(2), 68-71.
- Pietilainen, K. H., Kaprio, J., Borg, P., Plasqui, G., Yki-Jarvinen, H., Kujala, U. M., Rose, R. J., Westerterp, K. R., & Rissanen, A. (2008). Physical inactivity and obesity: a vicious circle. *Obesity (Silver Spring)*, 16(2), 409-414.
- Pineda Torra, I., Jamshidi, Y., Flavell, D. M., Fruchart, J. C., & Staels, B. (2002). Characterization of the human PPARalpha promoter: identification of a functional nuclear receptor response element. *Mol Endocrinol*, 16(5), 1013-1028.
- Plourde, G., & Karelis, A. D. (2014). Current issues in the identification and treatment of metabolically healthy but obese individuals. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 24(5), 455-459.
- Poirier, P., Giles, T. D., Bray, G. A., Hong, Y., Stern, J. S., Pi-Sunyer, F. X., Eckel, R. H., American Heart, A., Obesity Committee of the Council on Nutrition, P. A., & Metabolism. (2006a). Obesity and cardiovascular disease: pathophysiology, evaluation, and effect of weight loss: an update of the 1997 American Heart Association Scientific Statement on Obesity and Heart Disease from the Obesity Committee of the Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism. *Circulation*, 113(6), 898-918.
- Poirier, Y., Antonenkov, V. D., Glumoff, T., & Hiltunen, J. K. (2006b). Peroxisomal β-oxidation—A metabolic pathway with multiple functions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1763(12), 1413-1426.

- Poitout, V., Amyot, J., Semache, M., Zarrouki, B., Hagman, D., & Fontes, G. (2010a). Glucolipotoxicity of the pancreatic beta cell. *Biochimica et biophysica acta*, 1801(3), 289-298.
- Poitout, V., Amyot, J., Semache, M., Zarrouki, B., Hagman, D., & Fontés, G. (2010b). Glucolipotoxicity of the pancreatic beta cell. *Biochimica et biophysica acta*, *1801*(3), 289-298.
- Postic, C., & Girard, J. (2008a). Contribution of de novo fatty acid synthesis to hepatic steatosis and insulin resistance: lessons from genetically engineered mice. *J Clin Invest*, 118(3), 829-838.
- Postic, C., & Girard, J. (2008b). Contribution of de novo fatty acid synthesis to hepatic steatosis and insulin resistance: lessons from genetically engineered mice. *J Clin Invest*, 118(3), 829-838.
- Postic, C., & Magnuson, M. A. (2000). DNA excision in liver by an albumin-Cre transgene occurs progressively with age. *Genesis*, 26(2), 149-150.
- Povero, D., & Feldstein, A. E. (2016). Novel Molecular Mechanisms in the Development of Non-Alcoholic Steatohepatitis. *Diabetes Metab J*, 40(1), 1-11.
- Prentki, M., Joly, E., El-Assaad, W., & Roduit, R. (2002). Malonyl-CoA Signaling, Lipid Partitioning, and Glucolipotoxicity. *Role in* β -*Cell Adaptation and Failure in the Etiology of Diabetes,* 51(suppl 3), S405-S413.
- Primeau, V., Coderre, L., Karelis, A. D., Brochu, M., Lavoie, M. E., Messier, V., Sladek, R., & Rabasa-Lhoret, R. (2011). Characterizing the profile of obese patients who are metabolically healthy. *International journal of obesity (2005)*, 35(7), 971-981.
- Priyadarshini, M., Kotlo, K. U., Dudeja, P. K., & Layden, B. T. (2018). Role of Short Chain Fatty Acid Receptors in Intestinal Physiology and Pathophysiology. *Compr Physiol*, 8(3), 1091-1115.
- Puengel, T., De Vos, S., Krenkel, O., Pujuguet, P., Auberval, M., Marsais, F., Shoji, K. F., Saniere, L., Trautwein, C., Brys, R., & Tacke, F. (2018). Pharmacological inhibition of the medium chain fatty acid receptor GPR84 reduces myeloid cell in filtration into injured liver and ameliorates steatohepatitis and fibrosis. *Journal of Hepatology*, 68, S338.
- Pujol, J. B., Christinat, N., Ratinaud, Y., Savoia, C., Mitchell, S. E., & Dioum, E. H. M. (2018). Coordination of GPR40 and Ketogenesis Signaling by Medium Chain Fatty Acids Regulates Beta Cell Function. *Nutrients*, 10(4).

- Puri, P., Mirshahi, F., Cheung, O., Natarajan, R., Maher, J. W., Kellum, J. M., & Sanyal, A. J. (2008). Activation and dysregulation of the unfolded protein response in nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology*, 134(2), 568-576.
- Qiang, L., Wang, L., Kon, N., Zhao, W., Lee, S., Zhang, Y., Rosenbaum, M., Zhao, Y., Gu, W., Farmer, S. R., & Accili, D. (2012). Brown remodeling of white adipose tissue by SirT1-dependent deacetylation of Ppargamma. *Cell*, 150(3), 620-632.
- Rabanal-Ruiz, Y., Otten, E. G., & Korolchuk, V. I. (2017). mTORC1 as the main gateway to autophagy. *Essays in biochemistry*, *61*(6), 565-584.
- Radenne, A., Akpa, M., Martel, C., Sawadogo, S., Mauvoisin, D., & Mounier, C. (2008). Hepatic regulation of fatty acid synthase by insulin and T3: evidence for T3 genomic and nongenomic actions. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 295(4), E884-894.
- Rakhshandehroo, M., Knoch, B., Muller, M., & Kersten, S. (2010). Peroxisome proliferator-activated receptor alpha target genes. *PPAR research, vol. 2010*, 20 pages.
- Ramracheya, R., Chapman, C., Chibalina, M., Dou, H., Miranda, C., Gonzalez, A., Moritoh, Y., Shigeto, M., Zhang, Q., Braun, M., Clark, A., Johnson, P. R., Rorsman, P., & Briant, L. J. B. (2018). GLP-1 suppresses glucagon secretion in human pancreatic alpha-cells by inhibition of P/Q-type Ca(2+) channels. *Physiol Rep*, 6(17), e13852.
- Rankinen, T., Zuberi, A., Chagnon, Y. C., Weisnagel, S. J., Argyropoulos, G., Walts, B., Perusse, L., & Bouchard, C. (2006). The human obesity gene map: the 2005 update. *Obesity (Silver Spring)*, 14(4), 529-644.
- Recio, C., Lucy, D., Purvis, G. S. D., Iveson, P., Zeboudj, L., Iqbal, A. J., Lin, D., O'Callaghan, C., Davison, L., Griesbach, E., Russell, A. J., Wynne, G. M., Dib, L., Monaco, C., & Greaves, D. R. (2018). Activation of the Immune-Metabolic Receptor GPR84 Enhances Inflammation and Phagocytosis in Macrophages. *Frontiers in Immunology*, 9(1419).
- Rector, R. S., Payne, R. M., & Ibdah, J. A. (2008). Mitochondrial trifunctional protein defects: clinical implications and therapeutic approaches. *Advanced drug delivery reviews*, 60(13-14), 1488-1496.
- Reimann, F., Habib, A. M., Tolhurst, G., Parker, H. E., Rogers, G. J., & Gribble, F. M. (2008). Glucose sensing in L cells: a primary cell study. *Cell Metab*, 8(6), 532-539.
- Reuter, C. P., Silva, P. T., Renner, J. D., Mello, E. D., Valim, A. R., Pasa, L., Silva, R. D., & Burgos, M. S. (2016). Dyslipidemia is Associated with Unfit and Overweight-Obese Children and Adolescents. *Arq Bras Cardiol*.
- Rial, A. S. (2015). Effets de l'hexanoate, un acide gras à chaîne moyenne, sur le métabolisme des lipides et la sensibilité à l'insuline des hépatocytes. (Maîtrise en biologie). Université du Québec à Montréal,
- Rial, S. A., Karelis, A. D., Bergeron, K.-F., & Mounier, C. (2016a). Gut Microbiota and Metabolic Health: The Potential Beneficial Effects of a Medium Chain Triglyceride Diet in Obese Individuals. *Nutrients*, 8(5), 281.
- Rial, S. A., Karelis, A. D., Bergeron, K. F., & Mounier, C. (2016b). Gut Microbiota and Metabolic Health: The Potential Beneficial Effects of a Medium Chain Triglyceride Diet in Obese Individuals. *Nutrients*, 8(5).
- Rial, S. A., Ravaut, G., Malaret, T. B., Bergeron, K.-F., & Mounier, C. (2018a). Hexanoic, Octanoic and Decanoic Acids Promote Basal and Insulin-Induced Phosphorylation of the Akt-mTOR Axis and a Balanced Lipid Metabolism in the HepG2 Hepatoma Cell Line. *Molecules*, 23(9), 2315.
- Rial, S. A., Ravaut, G., Malaret, T. B., Bergeron, K. F., & Mounier, C. (2018b). Hexanoic, Octanoic and Decanoic Acids Promote Basal and Insulin-Induced Phosphorylation of the Akt-mTOR Axis and a Balanced Lipid Metabolism in the HepG2 Hepatoma Cell Line. *Molecules*, 23(9).
- Ricchi, M., Odoardi, M. R., Carulli, L., Anzivino, C., Ballestri, S., Pinetti, A., Fantoni, L. I., Marra, F., Bertolotti, M., Banni, S., Lonardo, A., Carulli, N., & Loria, P. (2009). Differential effect of oleic and palmitic acid on lipid accumulation and apoptosis in cultured hepatocytes. *J Gastroenterol Hepatol, 24*(5), 830-840.
- Ridaura, V. K., Faith, J. J., Rey, F. E., Cheng, J., Duncan, A. E., Kau, A. L., Griffin, N. W., Lombard, V., Henrissat, B., Bain, J. R., Muehlbauer, M. J., Ilkayeva, O., Semenkovich, C. F., Funai, K., Hayashi, D. K., Lyle, B. J., Martini, M. C., Ursell, L. K., Clemente, J. C., Van Treuren, W., Walters, W. A., Knight, R., Newgard, C. B., Heath, A. C., & Gordon, J. I. (2013). Gut microbiota from twins discordant for obesity modulate metabolism in mice. *Science*, 341(6150), 1241214.
- Rieusset, J. (2018). The role of endoplasmic reticulum-mitochondria contact sites in the control of glucose homeostasis: an update. *Cell Death & Disease*, 9(3), 388.

- Rimbach, G., Melchin, M., Moehring, J., & Wagner, A. E. (2009). Polyphenols from cocoa and vascular health-a critical review. *International journal of molecular sciences*, 10(10), 4290-4309.
- Rios-Covian, D., Ruas-Madiedo, P., Margolles, A., Gueimonde, M., de Los Reyes-Gavilan, C. G., & Salazar, N. (2016). Intestinal Short Chain Fatty Acids and their Link with Diet and Human Health. *Front Microbiol*, *7*, 185.
- Roberts, C. K., Hevener, A. L., & Barnard, R. J. (2013). Metabolic syndrome and insulin resistance: underlying causes and modification by exercise training. *Compr Physiol*, *3*(1), 1-58.
- Robertson, G., Leclercq, I., & Farrell, G. C. (2001). Nonalcoholic steatosis and steatohepatitis. II. Cytochrome P-450 enzymes and oxidative stress. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 281(5), G1135-1139.
- Roemers, P., Hulst, Y., van Heijningen, S., van Dijk, G., van Heuvelen, M. J. G., De Deyn, P. P., & van der Zee, E. A. (2019). Inducing Physical Inactivity in Mice: Preventing Climbing and Reducing Cage Size Negatively Affect Physical Fitness and Body Composition. *Frontiers in behavioral neuroscience*, 13, 221-221.
- Rolo, A. P., Teodoro, J. S., & Palmeira, C. M. (2012). Role of oxidative stress in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Free Radic Biol Med*, 52(1), 59-69.
- Roncero, C., & Goodridge, A. G. (1992). Hexanoate and octanoate inhibit transcription of the malic enzyme and fatty acid synthase genes in chick embryo hepatocytes in culture. *J Biol Chem, 267*(21), 14918-14927.
- Ronis, M. J., Baumgardner, J. N., Sharma, N., Vantrease, J., Ferguson, M., Tong, Y., Wu, X., Cleves, M. A., & Badger, T. M. (2013). Medium chain triglycerides dose-dependently prevent liver pathology in a rat model of non-alcoholic fatty liver disease. *Exp Biol Med (Maywood)*, 238(2), 151-162.
- Roszer, T. (2015). Understanding the Mysterious M2 Macrophage through Activation Markers and Effector Mechanisms. *Mediators Inflamm, 2015*, 816460.
- Rothwell, N. J., & Stock, M. J. (1988). The Cafeteria Diet as a Tool for Studies of Thermogenesis. J Nutr, 118(8), 925-928.
- Rourke, J. L., Hu, Q., & Screaton, R. A. (2018). AMPK and Friends: Central Regulators of β Cell Biology. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 29(2), 111-122.

- Rozengurt, E., Soares, H. P., & Sinnet-Smith, J. (2014). Suppression of feedback loops mediated by PI3K/mTOR induces multiple overactivation of compensatory pathways: an unintended consequence leading to drug resistance. *Mol Cancer Ther*, 13(11), 2477-2488.
- Rui, L. (2014). Energy metabolism in the liver. Compr Physiol, 4(1), 177-197.
- Samocha-Bonet, D., Dixit, V. D., Kahn, C. R., Leibel, R. L., Lin, X., Nieuwdorp, M., Pietilainen, K. H., Rabasa-Lhoret, R., Roden, M., Scherer, P. E., Klein, S., & Ravussin, E. (2014). Metabolically healthy and unhealthy obese--the 2013 Stock Conference report. *Obes Rev*, 15(9), 697-708.
- Sampath, H., & Ntambi, J. M. (2006). Stearoyl-coenzyme A desaturase 1, sterol regulatory element binding protein-1c and peroxisome proliferator-activated receptor-alpha: independent and interactive roles in the regulation of lipid metabolism. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 9(2), 84-88.
- Sampey, B. P., Vanhoose, A. M., Winfield, H. M., Freemerman, A. J., Muehlbauer, M. J., Fueger, P. T., Newgard, C. B., & Makowski, L. (2011). Cafeteria diet is a robust model of human metabolic syndrome with liver and adipose inflammation: comparison to high-fat diet. *Obesity (Silver Spring, Md.), 19*(6), 1109-1117.
- Samuel, V. T., Liu, Z. X., Qu, X., Elder, B. D., Bilz, S., Befroy, D., Romanelli, A. J., & Shulman, G. I. (2004). Mechanism of hepatic insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease. *J Biol Chem*, 279(31), 32345-32353.
- Samuel, V. T., Liu, Z. X., Wang, A., Beddow, S. A., Geisler, J. G., Kahn, M., Zhang, X. M., Monia, B. P., Bhanot, S., & Shulman, G. I. (2007). Inhibition of protein kinase Cepsilon prevents hepatic insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Invest*, 117(3), 739-745.
- Samuel, V. T., Petersen, K. F., & Shulman, G. I. (2010). Lipid-induced insulin resistance: unravelling the mechanism. *Lancet*, 375(9733), 2267-2277.
- Santilli, V., Bernetti, A., Mangone, M., & Paoloni, M. (2014). Clinical definition of sarcopenia. Clinical cases in mineral and bone metabolism : the official journal of the Italian Society of Osteoporosis, Mineral Metabolism, and Skeletal Diseases, 11(3), 177-180.
- Sartorius, T., Drescher, A., Panse, M., Lastovicka, P., Peter, A., Weigert, C., Kostenis, E., Ullrich, S., & Haring, H. U. (2015). Mice Lacking Free Fatty Acid Receptor 1 (GPR40/FFAR1) are Protected Against Conjugated Linoleic Acid-Induced

Fatty Liver but Develop Inflammation and Insulin Resistance in the Brain. *Cell Physiol Biochem*, 35(6), 2272-2284.

- Sato, K., Cho, Y., Tachibana, S., Chiba, T., Schneider, W. J., & Akiba, Y. (2005). Impairment of VLDL secretion by medium-chain fatty acids in chicken primary hepatocytes is affected by the chain length. J Nutr, 135(7), 1636-1641.
- Scalfi, L., Coltorti, A., & Contaldo, F. (1991). Postprandial thermogenesis in lean and obese subjects after meals supplemented with medium-chain and long-chain triglycerides. *Am J Clin Nutr*, 53(5), 1130-1133.
- Schanler, R. J., Goldblum, R. M., Garza, C., & Goldman, A. S. (1986). Enhanced fecal excretion of selected immune factors in very low birth weight infants fed fortified human milk. *Pediatr Res*, 20(8), 711-715.
- Schoettl, T., Fischer, I. P., & Ussar, S. (2018). Heterogeneity of adipose tissue in development and metabolic function. *J Exp Biol*, 221(Pt Suppl 1).
- Schönfeld, P., & Wojtczak, L. (2016). Short- and medium-chain fatty acids in energy metabolism: the cellular perspective. *Journal of lipid research*, 57(6), 943-954.
- Schrauwen, P., Schrauwen-Hinderling, V., Hoeks, J., & Hesselink, M. K. (2010). Mitochondrial dysfunction and lipotoxicity. *Biochimica et biophysica acta*, 1801(3), 266-271.
- Schreiber, R., Diwoky, C., Schoiswohl, G., Feiler, U., Wongsiriroj, N., Abdellatif, M., Kolb, D., Hoeks, J., Kershaw, E. E., Sedej, S., Schrauwen, P., Haemmerle, G., & Zechner, R. (2017). Cold-Induced Thermogenesis Depends on ATGL-Mediated Lipolysis in Cardiac Muscle, but Not Brown Adipose Tissue. *Cell Metabolism*, 26(5), 753-763.e757.
- Schroeder, B., Schulze, R. J., Weller, S. G., Sletten, A. C., Casey, C. A., & McNiven, M. A. (2015). The small GTPase Rab7 as a central regulator of hepatocellular lipophagy. *Hepatology*, 61(6), 1896-1907.
- Schweiger, M., Eichmann, T. O., Taschler, U., Zimmermann, R., Zechner, R., & Lass, A. (2014). Measurement of lipolysis. *Methods in enzymology*, *538*, 171-193.
- Scott, E. M. (2015). Circadian clocks, obesity and cardiometabolic function. *Diabetes, obesity & metabolism, 17 Suppl 1*, 84-89.
- Seale, P., Bjork, B., Yang, W., Kajimura, S., Chin, S., Kuang, S., Scimè, A., Devarakonda, S., Conroe, H. M., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P.,

Rudnicki, M. A., Beier, D. R., & Spiegelman, B. M. (2008). PRDM16 controls a brown fat/skeletal muscle switch. *Nature*, 454(7207), 961-967.

- Seaton, T. B., Welle, S. L., Warenko, M. K., & Campbell, R. G. (1986). Thermic effect of medium-chain and long-chain triglycerides in man. *Am J Clin Nutr*, 44(5), 630-634.
- Semenkovich, C. F., Wims, M., Noe, L., Etienne, J., & Chan, L. (1989). Insulin regulation of lipoprotein lipase activity in 3T3-L1 adipocytes is mediated at posttranscriptional and posttranslational levels. J Biol Chem, 264(15), 9030-9038.
- Senarath, S., Beppu, F., Yoshinaga, K., Nagai, T., Yoshida, A., & Gotoh, N. (2019). Comparison of the Effects of Long-chain Monounsaturated Fatty Acid Positional Isomers on Lipid Metabolism in 3T3-L1 Cells. J Oleo Sci, 68(4), 379-387.
- Sendler, M., Maertin, S., John, D., Persike, M., Weiss, F. U., Kruger, B., Wartmann, T., Wagh, P., Halangk, W., Schaschke, N., Mayerle, J., & Lerch, M. M. (2016). Cathepsin B Activity Initiates Apoptosis via Digestive Protease Activation in Pancreatic Acinar Cells and Experimental Pancreatitis. *J Biol Chem*, 291(28), 14717-14731.
- Senthilraja, P., & Kathiresan, K. (2015). In vitro cytotoxicity MTT assay in Vero, HepG2 and MCF -7 cell lines study of Marine Yeast. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 080-084.
- Serino, M., Luche, E., Gres, S., Baylac, A., Berge, M., Cenac, C., Waget, A., Klopp, P., Iacovoni, J., Klopp, C., Mariette, J., Bouchez, O., Lluch, J., Ouarne, F., Monsan, P., Valet, P., Roques, C., Amar, J., Bouloumie, A., Theodorou, V., & Burcelin, R. (2012). Metabolic adaptation to a high-fat diet is associated with a change in the gut microbiota. *Gut*, *61*(4), 543-553.
- Sesti, G., Folli, F., Perego, L., Hribal, M. L., & Pontiroli, A. E. (2011). Effects of weight loss in metabolically healthy obese subjects after laparoscopic adjustable gastric banding and hypocaloric diet. *PLoS One*, 6(3), e17737.
- Sethi, S., Ziouzenkova, O., Ni, H., Wagner, D. D., Plutzky, J., & Mayadas, T. N. (2002). Oxidized omega-3 fatty acids in fish oil inhibit leukocyte-endothelial interactions through activation of PPAR alpha. *Blood*, 100(4), 1340-1346.
- Shahid, M. A., & Sharma, S. (2020). Physiology, Thyroid Hormone. In *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing

Copyright © 2020, StatPearls Publishing LLC.

- Shaw, N., Elholm, M., & Noy, N. (2003). Retinoic acid is a high affinity selective ligand for the peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta. *J Biol Chem*, 278(43), 41589-41592.
- Shen, L., Cui, A., Xue, Y., Cui, Y., Dong, X., Gao, Y., Yang, H., Fang, F., & Chang, Y. (2014). Hepatic differentiated embryo-chondrocyte-expressed gene 1 (Dec1) inhibits sterol regulatory element-binding protein-1c (Srebp-1c) expression and alleviates fatty liver phenotype. *J Biol Chem*, 289(34), 23332-23342.
- Shin, M. J., Hyun, Y. J., Kim, O. Y., Kim, J. Y., Jang, Y., & Lee, J. H. (2006). Weight loss effect on inflammation and LDL oxidation in metabolically healthy but obese (MHO) individuals: low inflammation and LDL oxidation in MHO women. *International journal of obesity (2005), 30*(10), 1529-1534.
- Shore, A. M., Karamitri, A., Kemp, P., Speakman, J. R., Graham, N. S., & Lomax, M. A. (2013). Cold-induced changes in gene expression in brown adipose tissue, white adipose tissue and liver. *PLoS One*, 8(7), e68933.
- Sica, A., & Mantovani, A. (2012). Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J Clin Invest, 122*(3), 787-795.
- Silbernagel, G., Kovarova, M., Cegan, A., Machann, J., Schick, F., Lehmann, R., Haring, H. U., Stefan, N., Schleicher, E., Fritsche, A., & Peter, A. (2012). High hepatic SCD1 activity is associated with low liver fat content in healthy subjects under a lipogenic diet. *J Clin Endocrinol Metab*, 97(12), E2288-2292.
- Sills, M. A., Forsythe, W. I., & Haidukewych, D. (1986). Role of octanoic and decanoic acids in the control of seizures. *Arch Dis Child*, *61*(12), 1173-1177.
- Sim, W. C., Park, S., Lee, K. Y., Je, Y. T., Yin, H. Q., Choi, Y. J., Sung, S. H., Park, S. J., Park, H. J., Shin, K. J., & Lee, B. H. (2014). LXR-alpha antagonist mesodihydroguaiaretic acid attenuates high-fat diet-induced nonalcoholic fatty liver. *Biochem Pharmacol*, 90(4), 414-424.
- Simopoulos, A. P. (2016). An Increase in the Omega-6/Omega-3 Fatty Acid Ratio Increases the Risk for Obesity. *Nutrients*, 8(3), 128-128.
- Singh, V., Chassaing, B., Zhang, L., San Yeoh, B., Xiao, X., Kumar, M., Baker, M. T., Cai, J., Walker, R., Borkowski, K., Harvatine, K. J., Singh, N., Shearer, G. C., Ntambi, J. M., Joe, B., Patterson, A. D., Gewirtz, A. T., & Vijay-Kumar, M. (2015). Microbiota-Dependent Hepatic Lipogenesis Mediated by Stearoyl CoA

Desaturase 1 (SCD1) Promotes Metabolic Syndrome in TLR5-Deficient Mice. *Cell Metab*, 22(6), 983-996.

- Sinha, R. A., Farah, B. L., Singh, B. K., Siddique, M. M., Li, Y., Wu, Y., Ilkayeva, O. R., Gooding, J., Ching, J., Zhou, J., Martinez, L., Xie, S., Bay, B. H., Summers, S. A., Newgard, C. B., & Yen, P. M. (2014). Caffeine stimulates hepatic lipid metabolism by the autophagy-lysosomal pathway in mice. *Hepatology*, 59(4), 1366-1380.
- Skurk, T., Alberti-Huber, C., Herder, C., & Hauner, H. (2007). Relationship between adipocyte size and adipokine expression and secretion. J Clin Endocrinol Metab, 92(3), 1023-1033.
- Smiley, S. T., Reers, M., Mottola-Hartshorn, C., Lin, M., Chen, A., Smith, T. W., Steele, G. D., & Chen, L. B. (1991). Intracellular heterogeneity in mitochondrial membrane potentials revealed by a J-aggregate-forming lipophilic cation JC-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(9), 3671-3675.
- Smith, J., Su, X., El-Maghrabi, R., Stahl, P. D., & Abumrad, N. A. (2008). Opposite regulation of CD36 ubiquitination by fatty acids and insulin: effects on fatty acid uptake. *J Biol Chem*, 283(20), 13578-13585.
- Smith, K. B., & Smith, M. S. (2016a). Obesity Statistics. *Primary Care: Clinics in Office Practice*, 43(1), 121-135.
- Smith, K. B., & Smith, M. S. (2016b). Obesity Statistics. *Prim Care, 43*(1), 121-135, ix.
- Soffientini, U., & Graham, A. (2016). Intracellular cholesterol transport proteins: roles in health and disease. *Clin Sci (Lond)*, *130*(21), 1843-1859.
- Solinas, G., Borén, J., & Dulloo, A. G. (2015). De novo lipogenesis in metabolic homeostasis: More friend than foe? *Molecular Metabolism*, 4(5), 367-377.
- Sommer, F., Stahlman, M., Ilkayeva, O., Arnemo, J. M., Kindberg, J., Josefsson, J., Newgard, C. B., Frobert, O., & Backhed, F. (2016). The Gut Microbiota Modulates Energy Metabolism in the Hibernating Brown Bear Ursus arctos. *Cell Rep, 14*(7), 1655-1661.
- Son, N. H., Basu, D., Samovski, D., Pietka, T. A., Peche, V. S., Willecke, F., Fang, X., Yu, S. Q., Scerbo, D., Chang, H. R., Sun, F., Bagdasarov, S., Drosatos, K., Yeh, S. T., Mullick, A. E., Shoghi, K. I., Gumaste, N., Kim, K., Huggins, L. A.,

Lhakhang, T., Abumrad, N. A., & Goldberg, I. J. (2018). Endothelial cell CD36 optimizes tissue fatty acid uptake. *J Clin Invest, 128*(10), 4329-4342.

- Song, A. J., & Palmiter, R. D. (2018). Detecting and Avoiding Problems When Using the Cre-lox System. *Trends in genetics : TIG, 34*(5), 333-340.
- Sopjani, M., Bhavsar, S. K., Fraser, S., Kemp, B. E., Foller, M., & Lang, F. (2010). Regulation of Na+-coupled glucose carrier SGLT1 by AMP-activated protein kinase. *Mol Membr Biol*, 27(2-3), 137-144.
- Southern, W. M., Nichenko, A. S., Shill, D. D., Spencer, C. C., Jenkins, N. T., McCully, K. K., & Call, J. A. (2017). Skeletal muscle metabolic adaptations to endurance exercise training are attainable in mice with simvastatin treatment. *PLoS One*, *12*(2), e0172551.
- Spadaro, L., Magliocco, O., Spampinato, D., Piro, S., Oliveri, C., Alagona, C., Papa, G., Rabuazzo, A. M., & Purrello, F. (2008). Effects of n-3 polyunsaturated fatty acids in subjects with nonalcoholic fatty liver disease. *Dig Liver Dis*, 40(3), 194-199.
- Speliotes, E. K., Yerges-Armstrong, L. M., Wu, J., Hernaez, R., Kim, L. J., Palmer, C. D., Gudnason, V., Eiriksdottir, G., Garcia, M. E., Launer, L. J., Nalls, M. A., Clark, J. M., Mitchell, B. D., Shuldiner, A. R., Butler, J. L., Tomas, M., Hoffmann, U., Hwang, S. J., Massaro, J. M., O'Donnell, C. J., Sahani, D. V., Salomaa, V., Schadt, E. E., Schwartz, S. M., Siscovick, D. S., Nash, C. R. N., Consortium, G., Investigators, M., Voight, B. F., Carr, J. J., Feitosa, M. F., Harris, T. B., Fox, C. S., Smith, A. V., Kao, W. H., Hirschhorn, J. N., Borecki, I. B., & Consortium, G. (2011). Genome-wide association analysis identifies variants associated with nonalcoholic fatty liver disease that have distinct effects on metabolic traits. *PLoS Genet*, 7(3), e1001324.
- Spink, A. J., Tegelenbosch, R. A., Buma, M. O., & Noldus, L. P. (2001). The EthoVision video tracking system--a tool for behavioral phenotyping of transgenic mice. *Physiol Behav*, 73(5), 731-744.
- St-Jules, D. E., Watters, C. A., Brunt, E. M., Wilkens, L. R., Novotny, R., Belt, P., Lavine, J. E., & Nonalcoholic Steatohepatitis Clinical Research, N. (2013). Estimation of fish and omega-3 fatty acid intake in pediatric nonalcoholic fatty liver disease. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 57(5), 627-633.
- St-Onge, M. P., Bosarge, A., Goree, L. L., & Darnell, B. (2008). Medium chain triglyceride oil consumption as part of a weight loss diet does not lead to an adverse metabolic profile when compared to olive oil. J Am Coll Nutr, 27(5), 547-552.

- St-Onge, M. P., Bourque, C., Jones, P. J., Ross, R., & Parsons, W. E. (2003a). Mediumversus long-chain triglycerides for 27 days increases fat oxidation and energy expenditure without resulting in changes in body composition in overweight women. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 27(1), 95-102.
- St-Onge, M. P., & Jones, P. J. (2003). Greater rise in fat oxidation with medium-chain triglyceride consumption relative to long-chain triglyceride is associated with lower initial body weight and greater loss of subcutaneous adipose tissue. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 27(12), 1565-1571.
- St-Onge, M. P., Lamarche, B., Mauger, J. F., & Jones, P. J. (2003b). Consumption of a functional oil rich in phytosterols and medium-chain triglyceride oil improves plasma lipid profiles in men. J Nutr, 133(6), 1815-1820.
- St-Onge, M. P., Mayrsohn, B., O'Keeffe, M., Kissileff, H. R., Choudhury, A. R., & Laferrere, B. (2014a). Impact of medium and long chain triglycerides consumption on appetite and food intake in overweight men. *Eur J Clin Nutr*, 68(10), 1134-1140.
- St-Onge, M. P., Mayrsohn, B., O'Keeffe, M., Kissileff, H. R., Choudhury, A. R., & Laferrère, B. (2014b). Impact of medium and long chain triglycerides consumption on appetite and food intake in overweight men. *Eur J Clin Nutr*, 68(10), 1134-1140.
- St-Onge, M. P., Ross, R., Parsons, W. D., & Jones, P. J. (2003c). Medium-chain triglycerides increase energy expenditure and decrease adiposity in overweight men. Obes Res, 11(3), 395-402.
- Stefan, N., & Haring, H. U. (2011). The metabolically benign and malignant fatty liver. *Diabetes*, 60(8), 2011-2017.
- Stefan, N., Peter, A., Cegan, A., Staiger, H., Machann, J., Schick, F., Claussen, C. D., Fritsche, A., Haring, H. U., & Schleicher, E. (2008). Low hepatic stearoyl-CoA desaturase 1 activity is associated with fatty liver and insulin resistance in obese humans. *Diabetologia*, 51(4), 648-656.
- Steinert, R. E., Schirra, J., Meyer-Gerspach, A. C., Kienle, P., Fischer, H., Schulte, F., Goeke, B., & Beglinger, C. (2014). Effect of glucagon-like peptide-1 receptor antagonism on appetite and food intake in healthy men. *Am J Clin Nutr*, 100(2), 514-523.
- Stock, M. J., & Cinti, S. (2003). ADIPOSE TISSUE | Structure and Function of Brown Adipose Tissue. In B. Caballero (Ed.), *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition (Second Edition)* (pp. 29-34). Oxford: Academic Press.

- Stoner, H. B. (1973). The role of the liver in non-shivering thermogenesis in the rat. *The Journal of Physiology*, 232(2), 285-296.
- Strable, M. S., & Ntambi, J. M. (2010). Genetic control of de novo lipogenesis: role in diet-induced obesity. Crit Rev Biochem Mol Biol, 45(3), 199-214.
- Straub, B. K., Stoeffel, P., Heid, H., Zimbelmann, R., & Schirmacher, P. (2008). Differential pattern of lipid droplet-associated proteins and de novo perilipin expression in hepatocyte steatogenesis. *Hepatology*, 47(6), 1936-1946.
- Sun, D., Zhang, L., Chen, H., Feng, R., Cao, P., & Liu, Y. (2017a). Effects of Antarctic krill oil on lipid and glucose metabolism in C57BL/6J mice fed with high fat diet. *Lipids Health Dis*, 16(1), 218.
- Sun, P., Wang, T., Zhou, Y., Liu, H., Jiang, H., Zhu, W., & Wang, H. (2013). DC260126: a small-molecule antagonist of GPR40 that protects against pancreatic beta-Cells dysfunction in db/db mice. *PLoS One*, 8(6), e66744.
- Sun, Y. Y., Li, X. F., Meng, X. M., Huang, C., Zhang, L., & Li, J. (2017b). Macrophage Phenotype in Liver Injury and Repair. *Scand J Immunol*, 85(3), 166-174.
- Sundqvist, M., Christenson, K., Holdfeldt, A., Gabl, M., Mårtensson, J., Björkman, L., Dieckmann, R., Dahlgren, C., & Forsman, H. (2018). Similarities and differences between the responses induced in human phagocytes through activation of the medium chain fatty acid receptor GPR84 and the short chain fatty acid receptor FFA2R. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research, 1865*(5), 695-708.
- Suwa, M., Nakano, H., & Kumagai, S. (2003). Effects of chronic AICAR treatment on fiber composition, enzyme activity, UCP3, and PGC-1 in rat muscles. *J Appl Physiol (1985), 95*(3), 960-968.
- Suzuki, M., Takaishi, S., Nagasaki, M., Onozawa, Y., Iino, I., Maeda, H., Komai, T., & Oda, T. (2013). Medium-chain fatty acid-sensing receptor, GPR84, is a proinflammatory receptor. *J Biol Chem*, 288(15), 10684-10691.
- Tachibana, S., Sato, K., Cho, Y., Chiba, T., Schneider, W. J., & Akiba, Y. (2005). Octanoate reduces very low-density lipoprotein secretion by decreasing the synthesis of apolipoprotein B in primary cultures of chicken hepatocytes. *Biochimica et biophysica acta*, 1737(1), 36-43.
- Tachibana, S., Sato, K., Takahashi, T., & Akiba, Y. (2002). Octanoate inhibits very low-density lipoprotein secretion in primary cultures of chicken hepatocytes. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, 132(3), 621-627.

- Tamura, S., & Shimomura, I. (2005). Contribution of adipose tissue and de novo lipogenesis to nonalcoholic fatty liver disease. *Journal of Clinical Investigation*, 115(5), 1139-1142.
- Tang, Z., Zhang, W., Wan, C., Xu, G., Nie, X., Zhu, X., Xia, N., Zhao, Y., Wang, S., Cui, S., & Wang, C. (2015). TRAM1 protect HepG2 cells from palmitate induced insulin resistance through ER stress-JNK pathway. *Biochem Biophys Res Commun*, 457(4), 578-584.
- Tanida, I. (2011). Autophagy basics. Microbiol Immunol, 55(1), 1-11.
- Tanida, I., Ueno, T., & Kominami, E. (2008). LC3 and Autophagos. *Autophagosome* and Phagosome, 77-88.
- Tarhda, Z., & Ibrahimi, A. (2015). Insight into the mechanism of lipids binding and uptake by CD36 receptor. *Bioinformation*, 11(6), 302-306.
- Tchernof, A., & Després, J.-P. (2013). Pathophysiology of Human Visceral Obesity: An Update. *Physiological Reviews*, 93(1), 359-404.
- Teli, M. R., James, O. F., Burt, A. D., Bennett, M. K., & Day, C. P. (1995). The natural history of nonalcoholic fatty liver: a follow-up study. *Hepatology*, 22(6), 1714-1719.
- Thau, L., & Sharma, S. (2020). Physiology, Cortisol. In *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing
- Copyright © 2020, StatPearls Publishing LLC.
- Thurmond, D. C., Baillie, R. A., & Goodridge, A. G. (1998). Regulation of the action of steroid/thyroid hormone receptors by medium-chain fatty acids. *J Biol Chem*, 273(25), 15373-15381.
- Titchenell, P. M., Quinn, W. J., Lu, M., Chu, Q., Lu, W., Li, C., Chen, H., Monks, B. R., Chen, J., Rabinowitz, J. D., & Birnbaum, M. J. (2016). Direct Hepatocyte Insulin Signaling Is Required for Lipogenesis but Is Dispensable for the Suppression of Glucose Production. *Cell Metab*, 23(6), 1154-1166.
- Tomita, T., Hosoda, K., Fujikura, J., Inagaki, N., & Nakao, K. (2014). The G-Protein-Coupled Long-Chain Fatty Acid Receptor GPR40 and Glucose Metabolism. *Frontiers in Endocrinology*, 5(152).
- Tovar, A. R., Torre-Villalvazo, I., Ochoa, M., Elias, A. L., Ortiz, V., Aguilar-Salinas, C. A., & Torres, N. (2005). Soy protein reduces hepatic lipotoxicity in

hyperinsulinemic obese Zucker fa/fa rats. Journal of lipid research, 46(9), 1823-1832.

- Traul, K. A., Driedger, A., Ingle, D. L., & Nakhasi, D. (2000). Review of the toxicologic properties of medium-chain triglycerides. *Food Chem Toxicol*, 38(1), 79-98.
- Trayhurn, P., & Beattie, J. H. (2001). Physiological role of adipose tissue: white adipose tissue as an endocrine and secretory organ. *Proc Nutr Soc*, 60(3), 329-339.
- Trexler, E., Smith-Ryan, A., & Norton, L. (2014). Metabolic adaptation to weight loss: Implications for the athlete. *Journal of the International Society of Sports Nutrition, 11*, 7.
- Tsuda, N., Kawaji, A., Sato, T., Takagi, M., Higashi, C., Kato, Y., Ogawa, K., Naba, H., Ohkouchi, M., Nakamura, M., Hosaka, Y., & Sakaki, J. (2017). A novel free fatty acid receptor 1 (GPR40/FFAR1) agonist, MR1704, enhances glucosedependent insulin secretion and improves glucose homeostasis in rats. *Pharmacology research & perspectives*, 5(4), e00340.
- Tsuji, H., Kasai, M., Takeuchi, H., Nakamura, M., Okazaki, M., & Kondo, K. (2001). Dietary medium-chain triacylglycerols suppress accumulation of body fat in a double-blind, controlled trial in healthy men and women. *J Nutr*, 131(11), 2853-2859.
- Tucci, S., Flogel, U., & Spiekerkoetter, U. (2015). Sexual dimorphism of lipid metabolism in very long-chain acyl-CoA dehydrogenase deficient (VLCAD-/-) mice in response to medium-chain triglycerides (MCT). *Biochimica et biophysica acta*, 1852(7), 1442-1450.
- Tumova, J., Andel, M., & Trnka, J. (2016). Excess of free fatty acids as a cause of metabolic dysfunction in skeletal muscle. *Physiol Res*, 65(2), 193-207.
- Turnbaugh, P. J., Ley, R. E., Mahowald, M. A., Magrini, V., Mardis, E. R., & Gordon, J. I. (2006). An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature*, 444(7122), 1027-1031.
- Turnbaugh, P. J., Ridaura, V. K., Faith, J. J., Rey, F. E., Knight, R., & Gordon, J. I. (2009). The effect of diet on the human gut microbiome: a metagenomic analysis in humanized gnotobiotic mice. *Sci Transl Med*, 1(6), 6ra14.

- Twells, L. K., Gregory, D. M., Reddigan, J., & Midodzi, W. K. (2014). Current and predicted prevalence of obesity in Canada: a trend analysis. *CMAJ Open*, 2(1), E18-26.
- Umamaheswaran, S., Dasari, S. K., Yang, P., Lutgendorf, S. K., & Sood, A. K. (2018). Stress, inflammation, and eicosanoids: an emerging perspective. *Cancer Metastasis Rev*, 37(2-3), 203-211.
- Uyama, N., Geerts, A., & Reynaert, H. (2004). Neural connections between the hypothalamus and the liver. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol, 280*(1), 808-820.
- Valle, A., Oliver, J., & Roca, P. (2010). Role of Uncoupling Proteins in Cancer. *Cancers*, 2(2), 567-591.
- Van Boeckel, T. P., Brower, C., Gilbert, M., Grenfell, B. T., Levin, S. A., Robinson, T. P., Teillant, A., & Laxminarayan, R. (2015). Global trends in antimicrobial use in food animals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(18), 5649-5654.
- Vázquez, L., Corzo-Martínez, M., Arranz-Martínez, P., Barroso, E., Reglero, G., & Torres, C. (2018). Bioactive Lipids. In *Sweeteners* (pp. 1-61).
- Vega, R. B., Huss, J. M., & Kelly, D. P. (2000). The coactivator PGC-1 cooperates with peroxisome proliferator-activated receptor alpha in transcriptional control of nuclear genes encoding mitochondrial fatty acid oxidation enzymes. *Molecular and cellular biology*, 20(5), 1868-1876.
- Velazquez, A., & Apovian, C. M. (2018). Pharmacological management of obesity. *Minerva Endocrinol*, 43(3), 356-366.
- Velho, S., Paccaud, F., Waeber, G., Vollenweider, P., & Marques-Vidal, P. (2010). Metabolically healthy obesity: different prevalences using different criteria. *Eur J Clin Nutr*, 64(10), 1043-1051.
- Velickovic, K., Wayne, D., Leija, H. A. L., Bloor, I., Morris, D. E., Law, J., Budge, H., Sacks, H., Symonds, M. E., & Sottile, V. (2019). Caffeine exposure induces browning features in adipose tissue in vitro and in vivo. *Scientific Reports*, 9(1), 9104.
- Vessby, B., Gustafsson, I. B., Tengblad, S., Boberg, M., & Andersson, A. (2002). Desaturation and elongation of Fatty acids and insulin action. *Ann N Y Acad Sci*, 967, 183-195.

- Villarroya, F., Iglesias, R., & Giralt, M. (2007). PPARs in the Control of Uncoupling Proteins Gene Expression. *PPAR research*, 2007, 74364-74364.
- Vingering, N., Oseredczuk, M., du Chaffaut, L., Ireland, J., & Ledoux, M. (2010). Fatty acid composition of commercial vegetable oils from the French market analysed using a long highly polar column. OCL, 17(3), 185-192.
- Virtue, S., & Vidal-Puig, A. (2010). Adipose tissue expandability, lipotoxicity and the Metabolic Syndrome--an allostatic perspective. *Biochimica et biophysica acta, 1801*(3), 338-349.
- Viswakarma, N., Jia, Y., Bai, L., Vluggens, A., Borensztajn, J., Xu, J., & Reddy, J. K. (2010). Coactivators in PPAR-Regulated Gene Expression. *PPAR research*, 2010, 250126.
- von Loeffelholz, C., & Birkenfeld, A. (2000). The Role of Non-exercise Activity Thermogenesis in Human Obesity. In K. R. Feingold, B. Anawalt, A. Boyce, G. Chrousos, K. Dungan, A. Grossman, J. M. Hershman, G. Kaltsas, C. Koch, P. Kopp, M. Korbonits, R. McLachlan, J. E. Morley, M. New, L. Perreault, J. Purnell, R. Rebar, F. Singer, D. L. Trence, A. Vinik, & D. P. Wilson (Eds.), *Endotext*. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.
- Waleh, M. Q. (2016). Impacts of Physical Activity on the Obese. *Prim Care*, 43(1), 97-107.
- Wanders, R. J. A., Komen, J., & Kemp, S. (2011). Fatty acid omega-oxidation as a rescue pathway for fatty acid oxidation disorders in humans. *The FEBS Journal*, 278(2), 182-194.
- Wang, B., Fu, J., Li, L., Gong, D., Wen, X., Yu, P., & Zeng, Z. (2016a). Medium-chain fatty acid reduces lipid accumulation by regulating expression of lipid-sensing genes in human liver cells with steatosis. *Int J Food Sci Nutr*, 67(3), 288-297.
- Wang, B., Li, L., Fu, J., Yu, P., Gong, D., Zeng, C., & Zeng, Z. (2016b). Effects of Long-Chain and Medium-Chain Fatty Acids on Apoptosis and Oxidative Stress in Human Liver Cells with Steatosis. J Food Sci, 81(3), H794-800.
- Wang, E. A., Israel, D. I., Kelly, S., & Luxenberg, D. P. (1993). Bone morphogenetic protein-2 causes commitment and differentiation in C3H10T1/2 and 3T3 cells. *Growth Factors*, 9(1), 57-71.
- Wang, H., Sreenivasan, U., Hu, H., Saladino, A., Polster, B. M., Lund, L. M., Gong, D.-w., Stanley, W. C., & Sztalryd, C. (2011). Perilipin 5, a lipid droplet-

associated protein, provides physical and metabolic linkage to mitochondria. *Journal of lipid research*, 52(12), 2159-2168.

- Wang, J., Han, S. L., Lu, D. L., Li, L. Y., Limbu, S. M., Li, D. L., Zhang, M. L., & Du, Z. Y. (2019). Inhibited Lipophagy Suppresses Lipid Metabolism in Zebrafish Liver Cells. *Front Physiol*, 10, 1077.
- Wang, L., Liu, Y., Yang, J., Zhao, H., Ke, J., Tian, Q., Zhang, L., Wen, J., Wei, R., & Hong, T. (2014). GLP-1 analog liraglutide enhances proinsulin processing in pancreatic beta-cells via a PKA-dependent pathway. *Endocrinology*, 155(10), 3817-3828.
- Wang, Q., Li, L., Xu, E., Wong, V., Rhodes, C., & Brubaker, P. L. (2004). Glucagonlike peptide-1 regulates proliferation and apoptosis via activation of protein kinase B in pancreatic INS-1 beta cells. *Diabetologia*, 47(3), 478-487.
- Wang, S., Zhao, Y., Xia, N., Zhang, W., Tang, Z., Wang, C., Zhu, X., & Cui, S. (2015a). KPNbeta1 promotes palmitate-induced insulin resistance via NF-kappaB signaling in hepatocytes. *J Physiol Biochem*, 71(4), 763-772.
- Wang, T. Y., Liu, M., Portincasa, P., & Wang, D. Q. H. (2013). New insights into the molecular mechanism of intestinal fatty acid absorption. *European journal of clinical investigation*, 43(11), 1203-1223.
- Wang, X., Raghavan, A., Chen, T., Qiao, L., Zhang, Y., Ding, Q., & Musunuru, K. (2016c). CRISPR-Cas9 Targeting of PCSK9 in Human Hepatocytes In Vivo-Brief Report. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology, 36(5), 783-786.
- Wang, Y., Ding, Y., Li, J., Chavan, H., Matye, D., Ni, H. M., Chiang, J. Y., Krishnamurthy, P., Ding, W. X., & Li, T. (2017). Targeting the Enterohepatic Bile Acid Signaling Induces Hepatic Autophagy via a CYP7A1-AKT-mTOR Axis in Mice. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, 3(2), 245-260.
- Wang, Y., Liu, Z., Han, Y., Xu, J., Huang, W., & Li, Z. (2018a). Medium Chain Triglycerides enhances exercise endurance through the increased mitochondrial biogenesis and metabolism. *PLoS One*, 13(2), e0191182.
- Wang, Y., Liu, Z., Han, Y., Xu, J., Huang, W., & Li, Z. (2018b). Medium Chain Triglycerides enhances exercise endurance through the increased mitochondrial biogenesis and metabolism. *PLoS One*, 13(2), e0191182-e0191182.
- Wang, Y., Viscarra, J., Kim, S. J., & Sul, H. S. (2015b). Transcriptional regulation of hepatic lipogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 16(11), 678-689.

- Wang, Y. X., Lee, C. H., Tiep, S., Yu, R. T., Ham, J., Kang, H., & Evans, R. M. (2003). Peroxisome-proliferator-activated receptor delta activates fat metabolism to prevent obesity. *Cell*, 113(2), 159-170.
- Waterland, R. A., Travisano, M., Tahiliani, K. G., Rached, M. T., & Mirza, S. (2008). Methyl donor supplementation prevents transgenerational amplification of obesity. *International journal of obesity (2005), 32*(9), 1373-1379.
- Wei, Y., Wang, D., Topczewski, F., & Pagliassotti, M. J. (2006). Saturated fatty acids induce endoplasmic reticulum stress and apoptosis independently of ceramide in liver cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 291(2), E275-281.
- Wein, S., Wolffram, S., Schrezenmeir, J., Gasperikova, D., Klimes, I., & Sebokova, E. (2009). Medium-chain fatty acids ameliorate insulin resistance caused by highfat diets in rats. *Diabetes Metab Res Rev*, 25(2), 185-194.
- Wheeler, M. C., & Gekakis, N. (2014). Hsp90 modulates PPARgamma activity in a mouse model of nonalcoholic fatty liver disease. *Journal of lipid research*, 55(8), 1702-1710.
- Wildman, R. P., Muntner, P., Reynolds, K., McGinn, A. P., Rajpathak, S., Wylie-Rosett, J., & Sowers, M. R. (2008). The obese without cardiometabolic risk factor clustering and the normal weight with cardiometabolic risk factor clustering: prevalence and correlates of 2 phenotypes among the US population (NHANES 1999-2004). Arch Intern Med, 168(15), 1617-1624.
- Wilfling, F., Haas, J. T., Walther, T. C., & Farese, R. V., Jr. (2014). Lipid droplet biogenesis. *Curr Opin Cell Biol, 29*, 39-45.
- Woods, S. C., & D'Alessio, D. A. (2008). Central control of body weight and appetite. *J Clin Endocrinol Metab*, 93(11 Suppl 1), S37-S50.
- Wu, T., Liu, Y. H., Fu, Y. C., Liu, X. M., & Zhou, X. H. (2014). Direct evidence of sirtuin downregulation in the liver of non-alcoholic fatty liver disease patients. *Ann Clin Lab Sci*, 44(4), 410-418.
- Xiao, F., Deng, J., Guo, Y., Niu, Y., Yuan, F., Yu, J., Chen, S., & Guo, F. (2016). BTG1 ameliorates liver steatosis by decreasing stearoyl-CoA desaturase 1 (SCD1) abundance and altering hepatic lipid metabolism. *Sci Signal*, 9(428), ra50.
- Xiao, X., Li, H., Qi, X., Wang, Y., Xu, C., Liu, G., Wen, G., & Liu, J. (2017). Zinc alpha2 glycoprotein alleviates palmitic acid-induced intracellular lipid accumulation in hepatocytes. *Mol Cell Endocrinol*, 439, 155-164.

- Xiong, J., Sun, P., Wang, Y., Hua, X., Song, W., Wang, Y., Wu, J., Yu, W., Liu, G., & Chen, L. (2019). Heterozygous deletion of Seipin in islet beta cells of male mice has an impact on insulin synthesis and secretion through reduced PPARgamma expression. *Diabetologia*.
- Xu, F., Lin, B., Zheng, X., Chen, Z., Cao, H., Xu, H., Liang, H., & Weng, J. (2016a). GLP-1 receptor agonist promotes brown remodelling in mouse white adipose tissue through SIRT1. *Diabetologia*, 59(5), 1059-1069.
- Xu, H., Zhou, Y., Liu, Y., Ping, J., Shou, Q., Chen, F., & Ruo, R. (2016b). Metformin improves hepatic IRS2/PI3K/Akt signaling in insulin-resistant rats of NASH and cirrhosis. *J Endocrinol*, 229(2), 133-144.
- Xu, J., Ji, J., & Yan, X. H. (2012). Cross-talk between AMPK and mTOR in regulating energy balance. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 52(5), 373-381.
- Xue, L.-L., Chen, H.-H., & Jiang, J.-G. (2017). Implications of glycerol metabolism for lipid production. *Progress in lipid research*, 68, 12-25.
- Yahagi, N., Shimano, H., Hasty, A. H., Matsuzaka, T., Ide, T., Yoshikawa, T., Amemiya-Kudo, M., Tomita, S., Okazaki, H., Tamura, Y., Iizuka, Y., Ohashi, K., Osuga, J., Harada, K., Gotoda, T., Nagai, R., Ishibashi, S., & Yamada, N. (2002). Absence of sterol regulatory element-binding protein-1 (SREBP-1) ameliorates fatty livers but not obesity or insulin resistance in Lep(ob)/Lep(ob) mice. *J Biol Chem*, 277(22), 19353-19357.
- Yamada, K., Mizukoshi, E., Sunagozaka, H., Arai, K., Yamashita, T., Takeshita, Y., Misu, H., Takamura, T., Kitamura, S., Zen, Y., Nakanuma, Y., Honda, M., & Kaneko, S. (2015). Characteristics of hepatic fatty acid compositions in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Liver Int*, 35(2), 582-590.
- Yamazaki, Y., Usui, I., Kanatani, Y., Matsuya, Y., Tsuneyama, K., Fujisaka, S., Bukhari, A., Suzuki, H., Senda, S., Imanishi, S., Hirata, K., Ishiki, M., Hayashi, R., Urakaze, M., Nemoto, H., Kobayashi, M., & Tobe, K. (2009). Treatment with SRT1720, a SIRT1 activator, ameliorates fatty liver with reduced expression of lipogenic enzymes in MSG mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 297(5), E1179-1186.
- Yang, G., Murashige, Danielle S., Humphrey, Sean J., & James, David E. (2015). A Positive Feedback Loop between Akt and mTORC2 via SIN1 Phosphorylation. *Cell Reports*, 12(6), 937-943.
- Yang, J. Y., Della-Fera, M. A., Rayalam, S., Park, H. J., Ambati, S., Hausman, D. B., Hartzell, D. L., & Baile, C. A. (2009). Regulation of adipogenesis by medium-

chain fatty acids in the absence of hormonal cocktail. J Nutr Biochem, 20(7), 537-543.

- Yang, L., Wei, J., Sheng, F., & Li, P. (2019). Attenuation of Palmitic Acid–Induced Lipotoxicity by Chlorogenic Acid through Activation of SIRT1 in Hepatocytes. *Mol Nutr Food Res*, 63(14), 1801432.
- Yang, M., Wei, D., Mo, C., Zhang, J., Wang, X., Han, X., Wang, Z., & Xiao, H. (2013a). Saturated fatty acid palmitate-induced insulin resistance is accompanied with myotube loss and the impaired expression of health benefit myokine genes in C2C12 myotubes. *Lipids in Health and Disease*, 12, 104-104.
- Yang, S., Xia, C., Li, S., Du, L., Zhang, L., & Zhou, R. (2014). Defective mitophagy driven by dysregulation of rheb and KIF5B contributes to mitochondrial reactive oxygen species (ROS)-induced nod-like receptor 3 (NLRP3) dependent proinflammatory response and aggravates lipotoxicity. *Redox biology*, 3, 63-71.
- Yang, Y., Atasoy, D., Su, H. H., & Sternson, S. M. (2011). Hunger states switch a flipflop memory circuit via a synaptic AMPK-dependent positive feedback loop. *Cell*, 146(6), 992-1003.
- Yang, Z. H., Miyahara, H., Iwasaki, Y., Takeo, J., & Katayama, M. (2013b). Dietary supplementation with long-chain monounsaturated fatty acids attenuates obesity-related metabolic dysfunction and increases expression of PPAR gamma in adipose tissue in type 2 diabetic KK-Ay mice. *Nutr Metab (Lond)*, 10(1), 16.
- Yao, H.-R., Liu, J., Plumeri, D., Cao, Y.-B., He, T., Lin, L., Li, Y., Jiang, Y.-Y., Li, J., & Shang, J. (2011). Lipotoxicity in HepG2 cells triggered by free fatty acids. *American Journal of Translational Research*, 3(3), 284-291.
- Yazici, D., & Sezer, H. (2017). Insulin Resistance, Obesity and Lipotoxicity. Adv Exp Med Biol, 960, 277-304.
- Yeo, D., Kang, C., Gomez-Cabrera, M. C., Vina, J., & Ji, L. L. (2019). Intensified mitophagy in skeletal muscle with aging is downregulated by PGC-1alpha overexpression in vivo. *Free Radic Biol Med*, 130, 361-368.
- Yin, Z., Pascual, C., & Klionsky, D. J. (2016). Autophagy: machinery and regulation. *Microb Cell*, 3(12), 588-596.
- Yki-Jarvinen, H. (2014). Non-alcoholic fatty liver disease as a cause and a consequence of metabolic syndrome. *Lancet Diabetes Endocrinol*, 2(11), 901-910.

- Yost, T. J., Jensen, D. R., Haugen, B. R., & Eckel, R. H. (1998). Effect of dietary macronutrient composition on tissue-specific lipoprotein lipase activity and insulin action in normal-weight subjects. *Am J Clin Nutr*, 68(2), 296-302.
- You, Y. Q., Ling, P. R., Qu, J. Z., & Bistrian, B. R. (2008). Effects of medium-chain triglycerides, long-chain triglycerides, or 2-monododecanoin on fatty acid composition in the portal vein, intestinal lymph, and systemic circulation in rats. JPEN J Parenter Enteral Nutr, 32(2), 169-175.
- Yun, H., Lee, J. H., Park, C. E., Kim, M.-J., Min, B.-I., Bae, H., Choe, W., Kang, I., Kim, S.-S., & Ha, J. (2009). Inulin Increases Glucose Transport in C2C12 Myotubes and HepG2 Cells via Activation of AMP-Activated Protein Kinase and Phosphatidylinositol 3-Kinase Pathways. *Journal of Medicinal Food*, 12(5), 1023-1028.
- Zentek, J., Buchheit-Renko, S., Ferrara, F., Vahjen, W., Van Kessel, A. G., & Pieper, R. (2011). Nutritional and physiological role of medium-chain triglycerides and medium-chain fatty acids in piglets. *Anim Health Res Rev, 12*(1), 83-93.
- Zentek, J., Ferrara, F., Pieper, R., Tedin, L., Meyer, W., & Vahjen, W. (2013). Effects of dietary combinations of organic acids and medium chain fatty acids on the gastrointestinal microbial ecology and bacterial metabolites in the digestive tract of weaning piglets. *J Anim Sci*, *91*(7), 3200-3210.
- Zhang, B., Hou, R., Zou, Z., Luo, T., Zhang, Y., Wang, L., & Wang, B. (2018). Mechanically induced autophagy is associated with ATP metabolism and cellular viability in osteocytes in vitro. *Redox biology*, 14, 492-498.
- Zhang, H., Li, Y., Hou, X., Zhang, L., & Wang, T. (2016). Medium-chain TAG improve energy metabolism and mitochondrial biogenesis in the liver of intrauterine growth-retarded and normal-birth-weight weanling piglets. *Br J Nutr*, 115(9), 1521-1530.
- Zhang, T. T., Xu, J., Wang, Y. M., & Xue, C. H. (2019). Health benefits of dietary marine DHA/EPA-enriched glycerophospholipids. *Progress in lipid research*, 75, 100997.
- Zhang, Y., Liu, Q., Yu, J., Yu, S., Wang, J., Qiang, L., & Gu, Z. (2017a). Locally Induced Adipose Tissue Browning by Microneedle Patch for Obesity Treatment. ACS Nano, 11(9), 9223-9230.
- Zhang, Y., Xia, G., Zhang, Y., Liu, J., Liu, X., Li, W., Lv, Y., Wei, S., Liu, J., & Quan, J. (2017b). Palmitate induces VSMC apoptosis via toll like receptor (TLR)4/ROS/p53 pathway. *Atherosclerosis*, 263, 74-81.

- Zhang, Y., Xu, Q., Liu, Y. H., Zhang, X. S., Wang, J., Yu, X. M., Zhang, R. X., Xue, C., Yang, X. Y., & Xue, C. Y. (2015). Medium-Chain Triglyceride Activated Brown Adipose Tissue and Induced Reduction of Fat Mass in C57BL/6J Mice Fed High-fat Diet. *Biomed Environ Sci*, 28(2), 97-104.
- Zhao, L., Ni, Y., Ma, X., Zhao, A., Bao, Y., Liu, J., Chen, T., Xie, G., Panee, J., Su, M., Yu, H., Wang, C., Hu, C., Jia, W., & Jia, W. (2016). A panel of free fatty acid ratios to predict the development of metabolic abnormalities in healthy obese individuals. *Scientific Reports*, 6, 28418.
- Zhao, N.-Q., Li, X.-Y., Wang, L., Feng, Z.-L., Li, X.-F., Wen, Y.-F., & Han, J.-X. (2017). Palmitate induces fat accumulation by activating C/EBPβ-mediated G0S2 expression in HepG2 cells. *World Journal of Gastroenterology*, 23(43), 7705-7715.
- Zhou, S., Wang, Y., Jacoby, J. J., Jiang, Y., Zhang, Y., & Yu, L. L. (2017a). Effects of Medium- and Long-Chain Triacylglycerols on Lipid Metabolism and Gut Microbiota Composition in C57BL/6J Mice. J Agric Food Chem, 65(31), 6599-6607.
- Zhou, S., Wang, Y., Jiang, Y., Zhang, Z., Sun, X., & Yu, L. L. (2017b). Dietary Intake of Structured Lipids with Different Contents of Medium-Chain Fatty Acids on Obesity Prevention in C57BL/6J Mice. J Food Sci, 82(8), 1968-1977.
- Zhu, Q., Liu, X., Glazier, B. J., Krolick, K. N., Yang, S., He, J., Lo, C. C., & Shi, H. (2019). Differential Sympathetic Activation of Adipose Tissues by Brain-Derived Neurotrophic Factor. *Biomolecules*, 9(9).
- Zimmermann, R., Strauss, J. G., Haemmerle, G., Schoiswohl, G., Birner-Gruenberger, R., Riederer, M., Lass, A., Neuberger, G., Eisenhaber, F., Hermetter, A., & Zechner, R. (2004). Fat mobilization in adipose tissue is promoted by adipose triglyceride lipase. *Science*, 306(5700), 1383-1386.
- Zoncu, R., Efeyan, A., & Sabatini, D. M. (2011). mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol, 12*(1), 21-35.
- Zou, L., Li, X., Wu, N., Jia, P., Liu, C., & Jia, D. (2017). Palmitate induces myocardial lipotoxic injury via the endoplasmic reticulum stressmediated apoptosis pathway. *Mol Med Rep*, 16(5), 6934-6939.