



**HAL**  
open science

# Rôle de LECT2 dans le cycle de division de l'hépatocyte et son implication dans le métabolisme lipidique

Sandrine Pham

► **To cite this version:**

Sandrine Pham. Rôle de LECT2 dans le cycle de division de l'hépatocyte et son implication dans le métabolisme lipidique . Biologie cellulaire. 2016. hal-01473140

**HAL Id: hal-01473140**

**<https://ephe.hal.science/hal-01473140>**

Submitted on 21 Feb 2017

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA  
RECHERCHE**

**ÉCOLE PRATIQUE DES HAUTES ÉTUDES**

**Sciences de la Vie et de la Terre**

**MÉMOIRE**

**Présenté  
par**

**Sandrine PHAM**

**Pour l'obtention du Diplôme de l'École Pratique des Hautes Études**

**“ Rôle de LECT2 dans le cycle de division de l'hépatocyte et son  
implication dans le métabolisme lipidique ”**

Soutenu le 10 Juin 2016 devant le jury suivant:

<b>Dr. Sophie THENET</b>	<b>Présidente</b>
<b>Dr. Christèle DESBOIS-MOUTHON</b>	<b>Rapporteur</b>
<b>Dr. Anne-Françoise BURNOL</b>	<b>Examineur</b>
<b>Dr. Jean-Pierre COUTY</b>	<b>Tuteur scientifique</b>
<b>Dr. Catherine PAUL</b>	<b>Tuteur pédagogique</b>

**Mémoire préparé sous la direction du:**

**Dr. Jean-Pierre COUTY (jean-pierre.couty@inserm.fr)**

**Equipe "Cycle cellulaire et Physiopathologie du Foie"**

**Directeur: Dr. Chantal DESDOUETS**

**Institut Cochin - INSERM U1016 - CNRS UMR8104 - Université Paris Descartes**

**24, rue du faubourg St Jacques, 75014 PARIS**

**Et du**

**Dr. Catherine PAUL (catherine.paul@u-bourgogne.fr)**

**Laboratoire d'Immunologie Immunothérapie des Cancers**

**Directeur: Dr. Ali BETTAIEB**

**EA 7269 EPHE (Sciences de la Vie et de la Terre)**

**7, Bd Jeanne d'Arc, BP 87900, 21079 Dijon**



# ÉCOLE PRATIQUE DES HAUTES ÉTUDES

Sciences de la Vie et de la Terre

## “ Rôle de LECT2 dans le cycle de division de l’hépatocyte et son implication dans le métabolisme lipidique ”

PHAM Sandrine

Soutenu le 10 Juin 2016

### RESUME

Le facteur LECT2 (Leukocyte Cell-Derived Chemotaxin 2) est une petite protéine de 16,4kDa sécrétée et produite majoritairement par le foie. Bien que quelques propriétés lui aient été attribuées dans la littérature, le rôle de LECT2 reste encore mal compris. Les objectifs de nos travaux sont de comprendre le rôle fonctionnel de LECT2 dans le tissu hépatique, et plus particulièrement son rôle d’une part dans le cycle de division de l’hépatocyte, et d’autre part son implication dans le métabolisme lipidique. Dans la première partie de ce travail, nous avons analysé les effets moléculaires de LECT2 sur la prolifération des hépatocytes, dans un contexte physiologique (*ex-vivo*, culture primaire d’hépatocytes), et dans un contexte physiopathologique de stress oxydant associé à l’inflammation (*in vivo*, CCl<sub>4</sub> et régime MCD) à partir de souris LECT2<sup>-/-</sup> vs WT. En absence de LECT2, nos résultats montrent une altération de la progression des hépatocytes dans le cycle cellulaire, suggérant un rôle de LECT2 dans le contrôle du cycle de division de l’hépatocyte. Dans la seconde partie de ce projet, nous avons étudié le rôle de LECT2 dans le métabolisme lipidique en physiologie. Nos résultats montrent, en absence de LECT2 une augmentation de l’expression de gènes impliqués dans la lipogenèse hépatique (SREBP-1c, FAS, ACC) et dans l’élimination et la dégradation du cholestérol (Cyp7a1, ABCG5, ABCG8). Ces résultats suggèrent que LECT2 intervient dans le contrôle du métabolisme lipidique, et qu’il pourrait être impliqué dans la physiopathologie hépatique dans la séquence NAFLD/NASH. De plus, nous montrons à la fois dans des modèles murins de NAFLD (Ob/Ob, HFD, MCD) et chez des patients NAFLD avec stéatose et stéato-hépatite (NASH), une augmentation significative des niveaux transcriptionnels de LECT2.

Ensemble, nos résultats suggèrent que LECT2, à travers la régulation du métabolisme lipidique, pourrait intervenir dans le contrôle du cycle de division de l’hépatocyte.

**Mots clés :** LECT2, hépatocyte, cycle cellulaire, métabolisme lipidique, cholestérol, NAFLD/NASH

# SOMMAIRE

<b>ABREVIATIONS</b>	<b>3</b>
<b>INTRODUCTION</b>	<b>6</b>
<b>I. LE FOIE</b>	<b>7</b>
1. STRUCTURE	7
2. COMPOSITION CELLULAIRE	8
3. FONCTIONS	9
4. SYSTEME IMMUNITAIRE HEPATIQUE	12
<b>II. LA PHYSIOLOGIE HÉPATIQUE</b>	<b>15</b>
1. LA REGENERATION HEPATIQUE	15
2. LA POLYPLOÏDIE HEPATIQUE	18
<b>III. LA PHYSIOPATHOLOGIE HEPATIQUE</b>	<b>21</b>
1. MISE EN PLACE DE LA STEATOSE HEPATIQUE	21
2. DE LA STEATOSE A LA STEATO-HEPATITE NON ALCOOLIQUE	26
3. VERS L'EMERGENCE DU CARCINOME HEPATOCELLULAIRE	36
<b>IV. RÔLE DU MICROENVIRONNEMENT IMMUNITAIRE DANS LE CHC</b>	<b>38</b>
1. SYSTEME IMMUNITAIRE ET CANCER	38
2. LE CARCINOME HEPATOCELLULAIRE	39
3. ROLE DU MICROENVIRONNEMENT IMMUNITAIRE DANS LE CHC MUTE POUR LA VOIE WNT/ $\beta$ -CATENINE	41
4. LEUKOCYTE CELL-DERIVED CHEMOTAXIN 2	42
<b>BIBLIOGRAPHIE</b>	<b>45</b>

## **ABREVIATIONS**

ABC : ATP Binding Cassette  
ACAT-2 : Acétyl-Coenzyme A acétyltransférase 2  
ACC : Acétyl-CoA Carboxylase  
ACS : Acyl-CoA synthase  
AG : Acides gras  
Apc : Adenomatous polyposis coli  
Apo : Apolipoprotéine  
ATP : Adénosine tri-phosphate  
BrdU : 5-deoxy-2'deoxyuridine  
BSEP : Bile Salt Export Protein  
CAT : Carnitine Acylcarnitine Translocase  
CCl<sub>4</sub> : Tétrachlorure de carbone  
CD-HFD: Choline deficient High Fat Diet  
CDK : Cyclin dépendant kinase  
CHC : Carcinome Hépatocellulaire  
ChREBP : Carbohydrate Response Element Binding Protein  
CK1 : Casein kinase 1  
CldU : 5-chloro-2'deoxyuridine  
CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité  
CPT : Carnitine Palmitoyltransferase  
CRP : C-Reactive Protein  
CTLA-4 : Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4  
CYP : Cytochrome P450  
Cyp7a1 : Cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase  
Cyp8b1 : Sterol 12 $\alpha$ -hydroxylase  
DAG : Diacylglycérol  
DAMP : Damage-associated molecular pattern molecules  
DEN: Diéthyle nitrosamine  
DGAT : Diacylglycérol acyltransferase  
DHE: Dihydroéthidium  
EGF : Epidermal Growth Factor  
EGFR : Epidermal Growth Factor Receptor  
FAS : Fatty Acid Synthase  
FGF : Fibroblast Growth Factor  
FXR : Farnésoid X récepteur

FXR : Farnesoid X Receptor  
G6P : Glucose -6- Phosphate  
GS : Glutamine synthase  
GSH : Gluthation réduit  
GSK3 : Glycogen synthase kinase 3  
HBV : Virus de l'Hépatite B  
HC-HFD: High Cholesterol High Fat Diet  
HCV : Virus de l'Hépatite C  
HDL : High Density Lipoprotein  
HE : Hemalun Eosine  
HFD: High Fat Diet  
HGF : Hepatocyte Growth Factor  
HMGCR : Hydroxy-méthyl-glutaryl-coenzyme A reductase  
HPV : Papilloma virus  
HSC : Hepatic Stellate Cells  
HSCs : Hepatic Stellate Cells  
HSL : Hormon sensitive lipase  
ICAM : Inter-Cellular Adhesion Molecule  
IDO : Indoleamine 2,3-dioxygenase  
IGF : Insulin growth factor  
IL : Interleukine  
iNKT : Invariant NKT  
LDL : Low Density Lipoprotein  
LECT2 : Leukocyte Cell Derived Chemotaxin 2  
LEF : Lymphoid Enhancer-binding Factor  
LPS : LipoPolySaccharide  
LSEC : Liver Sinusoid Endothelial Cells  
LSECs : Liver Sinusoid Endothelial Cells  
LXR : Liver X receptor  
LXR : Liver X Receptor  
MAP : Mitogen activated protein  
MCD : Methionine and Choline deficient Diet  
MCP1 : Monocyte chemoattractant protein-1  
MTP : Microsomal Triglycerids Transfer  
NAFL : Non Alcoholic Fatty Liver  
NAFLD : Non Alcoholic Fatty Liver Disease  
NASH : Non Alcoholic Stéato-Hépatitis

NF : Nuclear Factor  
NK : Natural Killer  
NLR : Nod Like Receptor  
NLRP3 : NOD-LRR-, and pyrin domain-containing 3  
NOD : Nucleotide binding oligomerization domain  
OAT : Ornithine aminotransferase  
PD-L1 : Programmed Cell Death Ligand 1  
PGE<sub>2</sub> : Prostaglandine 2  
PH : Partial hepatectomy  
PH : Partial Hepatectomy  
PHH3 : Phospho-Histone H3  
PTP: Phosphotyrosine phosphatase  
RE : Réticulum Endoplasmique  
ROS : Reactive oxygen species  
RXR: Retinoid X Receptor  
SCD1 : Stearoyl-CoA Desaturase 1  
SNC : Serum Normal de Chèvre  
SOCS : Suppressors of Cytokines Signalling  
SREBP : Sterol regulatory element binding protein  
SREBP1c : Sterol regulatory element binding protein-1  
STAT : Signal transducer and activator of transcription  
TCF : T-Cell Factor  
TG : Triglycérides  
TGF : Transforming Growth Factor  
TLR : Toll Like Receptor  
TNF : Tumor Necrosis Factor  
TRAIL : Tumor-necrosis-factor related apoptosis inducing ligand  
UPR : Unfolded Protein Response  
VCAM : Vascular Cell Adhesion Molecule  
VLDL : Very Low Density Lipoprotein  
XBP1 : X-box Binding protein 1

## INTRODUCTION

# I. LE FOIE

## 1. Structure

Le foie est, chez les mammifères, l'organe interne le plus volumineux de l'organisme. Il se compose de plusieurs lobes, dont le nombre varie en fonction de l'espèce. Chez l'Homme le foie possède deux lobes : le gauche et le droit ; alors que la souris en possède quatre : le médian, le gauche, le droit et le caudé. L'Homme et la souris possèdent également une vésicule biliaire. La vascularisation du foie est complexe, composée d'un système à double entrée du sang artériel et veineux. Il est alimenté en sang par l'artère hépatique et la veine porte alors que le sang efférent se déverse dans la veine centrolobulaire pour rejoindre les veines sus-hépatiques, puis la veine cave inférieure. La circulation artérielle constitue 25% des apports en sang alors que la circulation porte représente 75% des apports sanguins du foie.

L'unité structurelle du foie est le lobule (ou acinus) hépatique. Les lobules hépatiques sont des regroupements de cellules hépatiques de forme hexagonale, dont l'agencement est déterminé par la disposition des vaisseaux et des voies biliaires intra hépatiques (Rappaport, Borowy et al. 1954). Au centre du lobule se trouve la veine centrolobulaire, alors que chaque sommet de l'hexagone est constitué d'un espace porte (aussi appelé triade portale). Ce dernier se compose d'une veinule porte, d'une artériole hépatique et d'un canal biliaire. Au sein d'un lobule, les hépatocytes sont organisés en travées, allant d'un espace porte vers la veine centrolobulaire. Le sang qui entre dans le foie par la veine porte est riche en nutriments et toxines en provenance de l'intestin, tandis que le flux sanguin arrivant par l'artère hépatique draine du sang riche en oxygène. Le sang issu de cette double irrigation, circule le long des travées hépatocytaires à travers des capillaires sanguins appelés sinusoides. Ces sinusoides sont délimités par des cellules endothéliales, formant une barrière entre le sang et les hépatocytes. Cette région étroite entre hépatocytes et cellules endothéliales est appelé espace de Disse. Ainsi les hépatocytes sont en contact avec l'endothélium par leur pôle basolatéral alors que leur pôle apical forme la membrane des canalicules biliaires. Ces canalicules biliaires servent au transport de la bile produite par les hépatocytes. La circulation de la bile se fait dans le sens opposé à la circulation sanguine, c'est-à-dire de la veine centrolobulaire vers la veine porte. Au niveau de l'espace porte, la bile transite par le canal de Hering, qui assure la transition entre le canalicule et le canal biliaire, pour ensuite rejoindre les canaux biliaires extra-hépatiques, puis la vésicule biliaire où elle sera stockée.

## **2. Composition cellulaire**

Le foie se compose de différents types cellulaires qui lui permettent d'assurer l'ensemble de ses fonctions. Le parenchyme hépatique adulte est constitué d'hépatocytes, cellules épithéliales représentant 60% des cellules du foie, et de cellules épithéliales biliaires. Les autres types cellulaires du foie sont appelées cellules non parenchymateuses et sont diverses : cellules endothéliales sinusoidales, cellules étoilées et cellules immunitaires. L'ensemble de ces cellules est organisé dans l'espace afin de faciliter leurs interactions et d'assurer les différentes fonctions du tissu.

### ***a) Les hépatocytes***

Les hépatocytes sont les cellules majoritaires dans le foie. Elles constituent en effet 60% des cellules totales, et représentent 80% de la masse hépatique (Blouin, Bolender et al. 1977). Ce sont ces cellules qui assurent la majeure partie des fonctions hépatiques. Pour ce faire, ces cellules sont polarisées. La partie basale de ces cellules fait face aux sinusoides, tandis que la partie apicale participe à la formation des canalicules biliaires. Les hépatocytes sont de larges cellules polygonales, mesurant de 25 à 30µm. Afin de leur permettre d'assurer leurs fonctions, les hépatocytes possèdent une machinerie cellulaire très développée. En effet, on considère que 15% du volume de l'hépatocyte est occupé par le réticulum endoplasmique lisse et rugueux. De plus, son cytoplasme contient jusqu'à 30 lysosomes, 300 peroxyosomes et 50 complexes de Golgi. Le nombre de mitochondries est également très élevé : 1000 par hépatocyte (Weibel, Staubli et al. 1969). Il existe une grande variété de fonctions métaboliques assurées par les hépatocytes, fonctions sur lesquelles nous reviendrons (cf §I.3).

### ***b) Les cholangiocytes***

Les cholangiocytes sont les cellules épithéliales biliaires. Elle représentent 1% du nombre total de cellules hépatiques (Benedetti, Bassotti et al. 1996). Ils forment les canaux biliaires intra hépatiques qui permettent le transport de la bile. Ces cellules partagent un progéniteur commun avec les hépatocytes appelé hépatoblaste.

### ***c) Les cellules endothéliales***

Les cellules endothéliales du foie (ou LSECs, pour Liver Sinusoid Endothelial Cells) représentent approximativement 20% des cellules du parenchyme hépatique. Dépourvues de lame basale, ces cellules forment les sinusoides. D'autre part, elles présentent de larges fenestrations, pouvant aller de 100 à 170nm, formant ainsi des tamis qui permettent de nombreux échanges entre le sang et les hépatocytes (Smedsrod, De Bleser et al. 1994). Ces

cellules sont impliquées dans différentes fonctions au sein du tissu, allant de la coagulation à la régulation de la réponse immunitaire. Par ailleurs, l'altération de leur fonctionnement et de leurs fenestrations contribue au développement de maladies comme la cirrhose ou l'implantation de métastases tumorales. Les sinusoides contiennent une grande diversité de cellules immunitaires. En effet, la structure des sinusoides permet une extravasation facilitée pour les cellules immunitaires.

#### **d) Les cellules immunitaires**

Le foie a la particularité d'avoir son propre système immunitaire. Dans le foie, les cellules immunitaires représentent environ 20% du nombre total de cellules hépatiques. Ce système intra hépatique se compose de cellules myéloïdes dont les cellules de Kupffer, de cellules dendritiques et de lymphocytes (Lymphocytes T, Natural Killer (NK), NKT et B). Les cellules de Kupffer et le couple NK/NKT sont des populations résidentes du tissu hépatique. Ces différents acteurs participent à l'homéostasie de ce tissu.

#### **e) Les cellules étoilées**

Les cellules étoilées, ou cellules de Ito (ou encore HSC pour Hepatic Stellate Cells) sont localisées dans les espaces de Disse, autour des sinusoides. Elles sont très peu nombreuses dans le foie, et représentent moins de 1% des cellules. Cependant, ces cellules jouent un rôle important, puisqu'elles participent au stockage des gouttelettes lipidiques riches en vitamine A, et sont impliquées dans les mécanismes de développement et de réparation de la fibrose hépatique, grâce à leur interaction avec les cellules immunitaires (Friedman 2008).

### **3. Fonctions**

Le foie est un organe vital complexe, qui assure de nombreux processus physiologiques. Il assure trois principales fonctions : la synthèse, le stockage et l'épuration.

Le foie est composé d'hépatocytes qui sont extrêmement hétérogènes selon l'axe porto-central (Jungermann and Katz 1989). En effet, les hépatocytes dits « **périportaux** » sont situés à proximité de l'espace porte, et reçoivent un sang riche en oxygène et en hormones de l'artère hépatique, et riche en nutriments de la veine porte ; tandis que les hépatocytes dits « **périveineux** », localisés autour de la veine centrolobulaire sont soumis à des concentrations peu élevées en oxygène, hormones et nutriments. Cet axe porto-central définit la **zonation métabolique** du foie, avec deux zones distinctes dans un lobule hépatique : la **zone périveineuse** (la plus proche de la veine centrolobulaire) et la **zone périportale** (la plus proche de l'espace porte), avec une spécialisation des hépatocytes en fonction de leur

localisation (Jungermann and Kietzmann 1996). Ce concept a ainsi permis d'expliquer comment des fonctions qui peuvent sembler complètement opposées, comme la biosynthèse et la dégradation d'un même nutriment, pouvaient cohabiter dans le foie. Ce concept, initialement décrit pour le métabolisme des glucides, a été étendu au métabolisme des lipides et des protéines, ainsi qu'aux fonctions de détoxifications du foie, dont nous verrons les principales caractéristiques dans le paragraphe suivant (Haussinger, Lamers et al. 1992, Jungermann and Thurman 1992). Toutefois, il a été démontré que certaines fonctions hépatiques ne répondent pas à cette zonation, c'est notamment le cas pour la sécrétion des protéines sériques et de particules de VLDL (Very Low-Density Lipoprotein) qui se fait dans tous les hépatocytes (Kaestner 2009).

### **a) La fonction métabolique**

Le foie est le premier organe à rencontrer les nutriments après leur absorption intestinale. Il participe ainsi au stockage des vitamines et du fer, mais il joue également un rôle très important dans le métabolisme des hydrates de carbone, des acides gras et des protéines.

#### ➤ Le métabolisme des hydrates de carbone

Un des rôles primordial du foie dans le métabolisme des hydrates de carbone est de contrôler la glycémie. Dans un contexte d'hyperglycémie, les hépatocytes sont capables, en réponse à un signal insulinaire, d'absorber le glucose sanguin pour le transformer en glucose-6-phosphate (G6P) dans le foie. Ce G6P est alors soit, stocké sous forme de glycogène, soit glycolysé pour fournir du pyruvate, substrat énergétique du cycle de Krebs. A l'inverse, en conditions d'hypoglycémie, sous l'influence du glucagon, l'hépatocyte est capable d'utiliser le glycogène en réserve pour former du glucose (glycolyse) ou de synthétiser du glucose *de novo*, à partir de lactate, d'acides aminés ou de glycérol (néoglucogenèse).

#### ➤ Le métabolisme des acides gras

Les acides gras qui arrivent au niveau du foie sont rapidement transformés en triglycérides (TG). Ces TG peuvent ensuite servir de substrat énergétique à la  $\beta$ -oxydation (lipolyse). Cette réaction les transforme en acétyl-CoA, carburant énergétique du cycle de Krebs. Les TG peuvent également être exportés à destination des adipocytes, grâce à des lipoprotéines (chylomicrons, VLDL, LDL (Low Density Lipoprotein) et HDL (High Density Lipoprotein)), ou être stockés dans les hépatocytes, notamment lorsqu'il y a un excès d'apport et de synthèse des acides gras associé à une diminution des mécanismes de dégradation et

d'export au niveau hépatique. A l'inverse, le foie est également capable de synthétiser du cholestérol et des TG *de novo* à partir de l'Acétyl-CoA, par un mécanisme de lipogénèse.

#### ➤ Le métabolisme des protéines

Les protéines sont très rapidement dégradées en acides aminés, puis ces derniers sont désaminés dans le foie sous forme d'ammoniac, toxique pour l'organisme. Ce dernier est métabolisé sous forme d'urée pour être éliminé dans le cycle de l'urée. Contrairement aux hydrates de carbone ou aux acides gras, les protéines ne peuvent pas être stockées dans les hépatocytes. Les acides aminés, ainsi désaminés peuvent soit servir de substrat énergétique au cycle de Krebs, soit participer à la synthèse de protéines (l'albumine, la transferrine, la C-Réactive Protein (CRP) ou encore de nombreuses protéines participant à la coagulation) ou d'hormones (thrombopoïétine et l'Insulin Growth Factor I (IGF-1)). Celles-ci sont produites par le foie, puis relarguées dans la circulation sanguine.

#### **b) La fonction de détoxification**

Le foie est le premier filtre de l'organisme, il est, en permanence, soumis à des toxiques aussi bien endogènes, qu'exogènes (xénobiotiques). Les molécules qui sont hydrosolubles seront adressées vers le rein pour y être éliminées dans les urines. Les molécules liposolubles subissent quant à elles des modifications dans le foie afin de faciliter leur élimination. Celles-ci vont subir une première étape d'oxydo-réduction permettant d'augmenter la polarité des substrats toxiques catalysés par les cytochromes, et plus particulièrement le cytochrome P450. La seconde étape consiste ensuite à associer des substances endogènes, tels que le glutathion ou l'acide glucuronique, aux métabolites pour en augmenter l'hydrosolubilité, et ainsi faciliter leur évacuation via la bile ou les urines.

#### **c) La fonction d'excrétion**

Le foie est une glande mixte, dite amphicrine homotypique. En effet, les hépatocytes sont à la fois capables d'exercer des fonctions de sécrétions endocrines (les protéines et les hormones, qui une fois synthétisées, sont directement relarguées dans la circulation sanguine), et des fonctions de sécrétion exocrine : la production et la sécrétion de la bile. La bile se compose d'eau, de sels biliaires sécrétés à partir du cholestérol, de bilirubine et de mucus. Elle est synthétisée afin de faciliter la sécrétion de certains lipides et des xénobiotiques. La bile circule dans les canalicules biliaires, puis dans les canaux biliaires avant de se diriger dans la vésicule biliaire où elle sera stockée.

#### 4. Système immunitaire hépatique

Au delà des fonctions métaboliques de synthèse, de stockage et d'épuration que nous venons d'aborder, le foie joue aussi un rôle important dans la régulation de la réponse immunitaire. Le foie a la particularité d'avoir un système immunitaire qui lui est propre, toutes les cellules qui composent le parenchyme hépatique possèdent elles aussi, des propriétés immunologiques (Crispe, 2009). Comme nous l'avons vu précédemment, le foie est composé de 40% de cellules hépatiques non parenchymateuses (Non Parenchymal Cell, NPC). On dénombre 50% de cellules endothéliales et 50% de cellules immunitaires. Parmi ces dernières, plus de la moitié sont des cellules de l'immunité innée : 25% de cellules NKT (Natural Killer T), 20% de cellules de Kupffer, 7% de cellules NK (Natural Killer) et 3% de cellules dendritiques ; et pour les cellules adaptatives : 40% de lymphocytes T conventionnels et 5% de lymphocytes B (Racanelli and Rehermann 2006). L'ensemble de ces cellules constitue le **microenvironnement hépatique**.

##### *a) La tolérance hépatique*

Du fait de sa vascularisation particulière, le foie est constamment exposé à des antigènes du non-soi issus de l'alimentation et de la flore commensale. En effet 75% des apports sanguins proviennent directement du tractus intestinal. Une des fonctions du foie est notamment d'éliminer ces toxines pour éviter qu'elles ne rejoignent la circulation générale. Nous pouvons prendre l'exemple du LPS (LipoPolySaccharide), composant de la paroi cellulaire des bactéries Gram négatif. Chez un individu sain, le LPS est indétectable dans la circulation systémique, alors qu'il est cent fois plus important dans le sang de la veine porte (Lumsden, Henderson et al. 1988). Dans le foie beaucoup de cellules expriment le récepteur au LPS et aide à sa clairance. Le récepteur au LPS est constitué de la molécule TLR4 (Toll Like Receptor 4), associée aux molécules CD14 et MD2. La liaison du LPS à son récepteur permet la transduction d'un signal activant la réponse immunitaire. Pourtant dans le foie, étant donné son exposition permanente à de faibles concentrations de LPS, la liaison du LPS à son récepteur conduit à une réponse altérée et suppressive. De ce fait, le foie est le siège de réactions immunitaires complexes visant à tolérer cette exposition permanente aux antigènes bactériens et alimentaires. Le foie est un organe où l'environnement est immunosuppresseur et tolérant (Crispe, Giannandrea et al. 2006). Les mécanismes de tolérance hépatique font intervenir les cellules immunitaires innées et adaptatives, mais également toutes les autres cellules du parenchyme hépatique (Crispe 2009).

### ***b) Mécanismes de tolérance hépatique***

L'ensemble des cellules du microenvironnement hépatique maintient, en condition d'homéostasie, une réponse suppressive, par une exposition constante à de faibles niveaux d'endotoxines bactériennes. Ainsi, les cellules du microenvironnement hépatique sécrètent, de manière constitutive, des cytokines ayant des propriétés immunosuppressives : interleukine (IL) 10, transforming growth factor (TGF)- $\beta$ , arginase, indoleamine 2,3-dioxygénase (IDO) et prostaglandine 2 (PGE<sub>2</sub>) (Thomson and Knolle 2010). Ces cellules expriment également des ligands aux récepteurs d'immunosuppression comme le Programmed cell death ligand 1 (PD-L1) ou le cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4 (CTLA4) (Heymann and Tacke 2016). En plus de l'expression de ces molécules à propriétés immunosuppressives, les cellules du microenvironnement hépatique maintiennent également un faible taux d'expression des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) et ne présentent pas de molécules de co-stimulation à leur surface (Jenne and Kubes 2013). Une étude récente a permis de démontrer l'importance des cellules de Kupffer dans le maintien de la tolérance hépatique. En effet, au delà de leur capacité à sécréter de l'IL-10 en réponse à une stimulation du TLR4, et à l'expression constitutive de PD-L1, ces cellules sont capables d'induire la polarisation des lymphocytes T en lymphocytes T régulateurs (Heymann, Peusquens et al. 2015).

### ***c) Mécanismes d'activation de la réponse immunitaire***

Les cellules immunitaires, largement présentes dans le foie, contribuent au maintien de la tolérance hépatique. Toutefois, ces cellules sont également capables de répondre aux agressions du foie : elles jouent un rôle majeur dans les pathologies hépatiques. Il existe trois principaux types de mécanismes capables d'activer une réponse immunitaire non suppressive au sein du tissu hépatique. (1) Les signaux de dangers bactériens sont reconnus par l'intermédiaire des TLRs. Lorsqu'un TLR est très fortement activé, ou lorsque plusieurs TLRs sont activés simultanément, une réponse inflammatoire se met en place au sein du tissu. (2) Cette réponse immunitaire peut aussi être activée par des lésions des cellules du parenchyme hépatique, comme par exemple en cas de mort cellulaire. Les cellules lésées produisent en grande quantité des toxiques (acides biliaires, acides uriques, du cholestérol libre ou encore des lipides oxydés) qui seront reconnus par l'inflammasome. L'inflammasome est un complexe multi-protéique, appartenant aux récepteurs de la famille des protéines Nucleotide Binding Oligomerization Domain (NOD) capable de détecter les signaux de danger intracellulaires. Son activation induit une réponse pro-inflammatoire, par la sécrétion de deux cytokines majeures l'IL-1 $\beta$  et l'IL-18, qui activent les acteurs de la réponse immunitaire innée (monocytes, neutrophiles et NK). (3) Enfin, suite à des lésions, les hépatocytes sont capables

de produire des alarmines, qui activent en retour les cellules immunitaires environnantes (Heymann and Tacke 2016). Dans ce contexte, les cellules exprimeront fortement à leur surface des molécules de CMH, ainsi que des molécules de co-stimulation, afin de mettre en place une réponse immunitaire adaptative.

## II. LA PHYSIOLOGIE HÉPATIQUE

Nous avons vu dans la partie précédente que le foie est un organe original, d'une part, pour sa structure anatomique et sa composition cellulaire particulière et d'autre part, pour les nombreuses fonctions vitales qu'il exerce au sein de l'organisme. Le foie est un organe d'autant plus fascinant car il est le seul à avoir la propriété de se régénérer, mais il est aussi physiologiquement polyploïde.

### 1. La régénération hépatique

Le foie, à travers le large éventail de fonctions qu'il assure, est un organe central et indispensable de l'organisme. Au cours de la vie, il est soumis à différents stress et agressions (infections virales, stress oxydatif, surcharges métaboliques etc.). Pour lui permettre d'exercer pleinement ses fonctions, dans ce contexte, le foie est capable, bien que ce soit un organe quiescent à l'âge adulte, de se régénérer et de se réparer à volonté, tout en préservant son intégrité génomique. Afin de comprendre les mécanismes qui interviennent dans la régénération hépatique, des modèles d'études *in vivo* ont été développés : le modèle physiopathologique d'administration de produits chimiques ou le modèle le plus courant, celui de la résection d'une partie du foie.

#### a) *Modèle de régénération hépatique induite par des toxiques*

Le modèle de régénération induite par l'administration de composés hépatotoxiques repose sur une des principales fonctions du foie : la détoxification. Parmi les molécules utilisées dans les laboratoires, nous pouvons citer par exemple le tétrachlorure de carbone (CCl<sub>4</sub>), le thioacétamide, l'acétaminophène etc. L'administration de ces molécules induit dans un premier temps une cytolyse du parenchyme hépatique, qui s'accompagne d'une forte réponse inflammatoire, puis dans un second temps, la régénération compensatoire des hépatocytes, afin de remplacer les cellules nécrosées et ainsi restaurer l'intégrité du tissu hépatique. La prolifération des hépatocytes dans ce contexte n'est pas synchronisée en raison de l'action continue des toxiques.

#### b) *Modèle de régénération hépatique après hépatectomie partielle*

L'hépatectomie partielle et notamment l'hépatectomie des deux tiers du foie (partial hepatectomy, PH), est une approche très largement utilisée pour étudier les mécanismes impliqués dans la régénération hépatique (Michalopoulos and DeFrances 1997, Fausto, Campbell et al. 2006, Mitchell and Willenbring 2008). Cette technique présente l'avantage de n'induire qu'une très faible réponse inflammatoire, sans lésion tissulaire, avec une

prolifération synchronisée des hépatocytes. Suite à une hépatectomie partielle, différents signaux mitogéniques (cytokines et facteurs de croissance) induisent la « sortie » de quiescence et l'entrée des hépatocytes dans le cycle cellulaire (Michalopoulos 2007). La prolifération sera alors initiée dans les hépatocytes situés dans la zone périportale, suivi des hépatocytes localisés autour de la zone périverneuse. Les autres cellules du parenchyme hépatique prolifèrent plus tardivement: les cholangiocytes, cellules de Kupffer et cellules étoilées sont les secondes cellules à initier le cycle de division cellulaire, et enfin ce sont les cellules endothéliales qui entreront dans le cycle en fin de régénération. Les hépatocytes effectuent en moyenne 1,6 cycles de division afin de restaurer la masse hépatique initiale par un processus d'hyperplasie compensatoire des parties résiduelles (restauration de la masse hépatique initiale  $\pm 10\%$  ; (Stocker and Heine 1971)).

La restauration de la masse hépatique est donc associée, dans ce modèle, à la prolifération de cellules différenciées, sans intervention des cellules progénitrices (Grompe 2014, Yanger, Knigin et al. 2014). La régénération hépatique est un processus physiologique complexe, que nous pouvons séparer en trois phases : la phase de « priming » des hépatocytes, la phase de prolifération et la phase de terminaison.

➤ Phase de « priming » des hépatocytes

L'initiation de la réponse proliférative des hépatocytes est régulée principalement par la production de cytokines. Un des acteurs majoritaires responsable de la production de cytokines pro-inflammatoires, favorisant la transition G0/G1, est la cellule de Kupffer. En effet, lors de la PH, il y a des modifications du flux sanguin, entraînant une très forte augmentation de la concentration de LPS arrivant par la veine porte. Les cellules de Kupffer sont alors activées via leur récepteur TLR4 et induisent ainsi la production de Tumor Necrosis Factor (TNF)- $\alpha$ . Ce TNF- $\alpha$  se lie à son récepteur sur les cellules de Kupffer, pour induire la production d'IL-6, par l'intermédiaire de la voie Nuclear Factor (NF)- $\kappa$ B. Au niveau des hépatocytes, la fixation de l'IL-6 à son récepteur entraîne l'activation de la protéine signal transducer and activator of transcription (STAT)-3, par l'intermédiaire de la voie JAK/STAT. L'activation de la protéine STAT3 induit l'expression d'une batterie de gènes dits « immediate early genes » qui sont essentiels pour permettre aux hépatocytes d'effectuer la transition G0/G1, mais également pour protéger les hépatocytes de signaux nécrotiques ou apoptotiques (Taub 2004, Fausto, Campbell et al. 2006). Ces observations mettent en avant la contribution essentielle du microbiote intestinal dans le processus de régénération hépatique (Karin and Clevers 2016).

### ➤ Phase de prolifération

Une fois que les hépatocytes sont entrés en phase G1 du cycle cellulaire, ils sont réceptifs à une seconde vague de signaux qui leur permettra de réaliser la transition G1/S. Cette transition est notamment sous le contrôle de facteurs de croissance, impliquant deux voies de signalisation majeures : la voie passant par le récepteur à l'Epidermal Growth Factor (EGFR) et par le récepteur cMET (Borowiak, Garratt et al. 2004, Collin de Lhortet, Gilgenkrantz et al. 2012). Dès les premières heures après la PH, l'Epidermal Growth Factor (EGF), l'amphireguline et le TGF- $\alpha$  sont sécrétés pour interagir avec l'EGFR, tandis que l'Hepatocyte Growth Factor (HGF) est sécrété pour interagir avec son récepteur cMET. Ces facteurs de croissance sont sécrétés par différents types cellulaires ou tissus : l'EGF est relargué par le duodénum et les glandes salivaires, le TGF- $\alpha$  provient des hépatocytes, l'HGF est quant à lui sécrété, par les NPCs et notamment par les cellules étoilées. Les voies de signalisation sous-jacentes impliquent notamment la voie des Mitogen Activated Protein (MAP) kinases, STAT3, Akt et ERK1/2. Après la transition G1/S, il n'y a plus aucun point de blocage du cycle cellulaire nécessitant des facteurs de croissance, les hépatocytes effectuent leur phase S, G2 et leur mitose afin de restaurer la masse hépatique initiale.

### ➤ Phase terminale de régénération

Après avoir restauré la masse hépatique initiale, les hépatocytes vont arrêter de proliférer et retourner à l'état de cellules quiescentes. Cette régulation se fait par l'intermédiaire de voies de signalisations ayant des propriétés anti-prolifératives. Une des voies majoritaires impliquée dans ces mécanismes de régulation est la voie du TGF- $\beta$ . Le TGF- $\beta$ , principalement produit par les cellules étoilées, active les protéines de la famille des SMADs. L'expression du TGF- $\beta$  et des protéines SMADs est augmentée tout au long du processus de régénération hépatique, ainsi que les complexes inhibiteurs qui leurs sont associés. Ce n'est qu'en fin de processus de régénération hépatique que ces inhibiteurs diminuent de manière significative, pour ainsi permettre aux SMADs d'activer le retour en quiescence des hépatocytes. D'autres niveaux de régulation existent, comme notamment, l'activation des protéines Suppressors of Cytokines Signalling (SOCS), et particulièrement de SOCS 3 qui bloque l'expression de l'IL6 (Taub 2004).

## 2. La polyplœdie hépatique

### a) *Généralités sur la polyplœdie*

Une des caractéristiques communes des êtres vivants est de posséder son matériel génétique sous la forme de chromosomes. Leur nombre « n » est propre à chaque espèce : l'homme possède  $n=23$  chromosomes, tandis que la souris n'en possède que  $n=20$  chromosomes. Le nombre d'exemplaires d'un même chromosome peut varier d'une cellule à une autre ou d'une espèce à une autre, c'est ce qu'on appelle la **plœdie**. Ainsi, une cellule qui ne possède qu'une seule copie de chaque chromosome ( $n$ ) est dite haploïde, deux copies de chromosomes ( $2n$ ) est dite diploïde, trois copies ( $3n$ ) triploïde, etc... La **polyplœdie** se traduit donc par une modification du nombre de copies initiales de chromosomes.

Décrite il y a plus de 100ans chez les plantes, la polyplœdie est un phénomène largement répandu chez les eucaryotes (Otto and Whitton 2000). On distingue deux types de cellules polyplœides : les cellules **autopolyplœides** qui réunissent deux ou plusieurs génome identiques et les **alloplœides**, issues de deux ou de plusieurs génomes différents. Lorsque le nombre de chromosomes contenu dans une cellule est un multiple de  $n$ , on parle de cellule **euploïde**. Cependant, dans des conditions pathologiques, certaines cellules possèdent un nombre anormal de chromosomes, on parle de cellule **aneuploïde**. Enfin, on retrouve deux classes de cellules polyplœides : les cellules polyplœides **mononucléées**, issues du regroupement du matériel génétique au sein du même noyau ; ou les cellules polyplœides **bi- ou multinucléées**, issues respectivement de la répartition du matériel génétique dans deux noyaux ou plus.

#### ➤ La polyplœdie chez les mammifères

Chez les mammifères, bien que la majorité des cellules soient diploïdes, on peut observer la genèse de cellules polyplœides, de manière physiologique, dans de nombreux processus développementaux, pour aboutir à la formation de cellules hautement différenciées. Parmi ces cellules, nous pouvons citer les mégacaryocytes de la moelle osseuse ( $16n-128n$ ), les cardiomyocytes ( $4n$ ), les cellules géantes du trophoblaste ( $8n-64n$ ) ou encore les hépatocytes ( $4n-8n$ ) (Gupta 2000). La polyplœidisation peut également faire suite à un stress cellulaire (génotoxique, métabolique), ou à une atteinte tissulaire : c'est le cas par exemple pour les cellules musculaires lisses des vaisseaux dans l'hypertension, ou encore pour les cellules des muscles lisses utérins lors de la grossesse. Par ailleurs, dans le tissu utérin, des études ont pu mettre en évidence un rôle de l'infection par les *Papilloma virus* (HPV) dans la formation de cellules tétraploïdes (Incassati, Patel et al. 2006). Il est important de souligner

que des modifications pathologiques de la polyplœidie de certains tissus constituent une étape précoce de la progression tumorale. Dans les cancers du sein, du poumon, du cœlon, du pancréas, ou bien de l'œsophage, l'émergence de populations cellulaires tétraploïdes précède l'aneuploïdie et l'apparition d'instabilité chromosomique, dans les stades précoces de développement tumoral (Davoli and de Lange 2011).

➤ Mécanismes de polyplœidisation

Il existe quatre mécanismes de polyplœidisation décrits dans la littérature. Les cellules polyplœides peuvent être générées 1)-par fusion cellulaire (formation de cellules multinucléées) ou par des cycles cellulaires avortés2)-avant d'être rentrés en mitose (endoréplication), 3)-avant la fin de la mitose (mitotic slippage), ou bien4)- par cytotodièrèse incomplète.

**b) La polyplœidie physiologique dans le foie**

La polyplœidie cellulaire est une caractéristique essentielle du foie des mammifères. L'apparition de cellules polyplœides hépatiques accompagne la fin du développement fœtal et la maturation post-natale (Sigal, Rajvanshi et al. 1999, Gupta 2000). Le développement hépatique est un processus prolongé qui perdure au cours de la vie post-natale. Chez le rat, au 14<sup>ème</sup> jour de la vie embryonnaire (stade E.14), la majorité des hépatoblastes sont bipotents : ils ont la capacité de se différencier en hépatocytes ou en cellules biliaires. En revanche, au stade E.15, la plupart des hépatoblastes sont engagés dans le lignage hépatocytaire (Germain, Blouin et al. 1988, Shiojiri, Lemire et al. 1991). Au cours de la période restante de gestation, et au cours de quatre premières semaines après la naissance, les hépatoblastes acquièrent des fonctions d'hépatocytes différenciés. Cette période de développement est associée à une importante prolifération cellulaire entre la naissance et le quinzième jour de vie, suivie d'une diminution de la prolifération cellulaire. Au cours du sevrage, on observe une nouvelle phase de prolifération moins importante, corrélant avec la mise en place de la polyplœidie hépatocytaire (Celton-Morizur and Desdouets 2009). Les travaux antérieurs du laboratoire ont permis de montrer que la polyplœidisation du tissu hépatique est un phénomène régulé et progressif. Au cours des trois premières semaines après la naissance, la majorité des hépatocytes est diploïde. Après le sevrage, la proportion d'hépatocytes diploïdes diminue de manière significative, pour laisser place à un contingent d'hépatocytes tétraploïdes binucléés (2x2n) (Guidotti, Bregerie et al. 2003). La polyplœidisation du tissu hépatique est plus précisément contrôlée par la transition allaitement-sevrage (Margall-Ducos, Celton-Morizur et al. 2007). A ce stade du développement, la succession de divisions cellulaires complètes ou incomplètes permet une polyplœidisation progressive du foie au cours du développement post-

natal. Au cours du second et du troisième mois, les hépatocytes octoploïdes (binucléés  $2 \times 4n$  et mononucléés  $8n$ ) s'accumulent mais ne dépasseront pas 5 à 7% de la population totale (Seglen 1997). A l'âge adulte, les hépatocytes sont majoritairement tétraploïdes, 70% des hépatocytes chez le rongeur et 40% chez l'homme. Bien que le foie soit un organe quiescent chez l'adulte, il conserve une importante capacité proliférative. En effet, en réponse à différents stimuli ou agressions (surcharge métabolique, hépatectomie partielle, altérations induites par des drogues etc.), il est capable d'induire une forte réponse proliférative et de moduler sa ploïdie.

De manière intéressante, notre équipe a très récemment démontré une modification des mécanismes qui régulent la ploïdie hépatocytaire dans un contexte pathologique de stéatose hépatique, en utilisant des modèles murins et des cohortes de patients. En effet, on observe, dans ce contexte pathologique, une conversion de la ploïdie physiologique (hépatocytes tétraploïdes binucléés,  $2 \times 2n$ ) en une ploïdie pathologique, (hépatocytes mononucléés hautement polyploïdes  $\geq 8n$ , rarement observé en conditions physiologiques). Nous avons pu mettre en évidence un rôle clé du stress oxydatif dans la genèse de contingent d'hépatocytes hautement polyploïdes, à travers l'activation du signal de réponse à des dommages à l'ADN (ATR/p53/p21). Ce dernier empêche l'activation du complexe cycline B1/Cyclin dépendant kinase (CDK)1 et induit des cycles d'endoréplication (Gentric, Maillet et al. 2015). Ces résultats démontrent pour la première fois, la mise en place d'une polyploïdisation pathologique du tissu hépatique au cours des hépatopathies stéatosiques non alcooliques, dont nous verrons les principales caractéristiques dans le chapitre suivant.

### **III. LA PHYSIOPATHOLOGIE HEPATIQUE**

Il existe de nombreuses maladies hépatiques qui peuvent, dans certains cas, perturber gravement le fonctionnement de l'organisme. Les principaux facteurs de risque, de développer une hépatopathie, sont les infections par les virus de l'hépatite B (HBV) et de l'hépatite C (HCV), l'alcoolisme chronique, et plus récemment le syndrome métabolique, qui constitue aujourd'hui un véritable problème de santé publique dans les pays développés. Ce dernier se manifeste par l'association de plusieurs symptômes : obésité, résistance à l'insuline, diabète de type 2, hypertension, dyslipidémie. Au niveau du foie, le syndrome métabolique se manifeste par des hépatopathies stéatosiques dites non-alcooliques (Non Alcoholic Fatty Liver Disease, NAFLD)(Marchesini, Bugianesi et al. 2003). Les NAFLD sont caractérisées par un spectre de désordres hépatiques bien définis allant de la simple accumulation d'acides gras dans les hépatocytes (stéatose) au développement d'une stéato-hépatite non alcoolique (Non Alcoholic Steato Hepatitis – NASH) caractérisée par une inflammation chronique. Ceci pourra alors favoriser le développement d'une cirrhose (fibrose sévère) et/ou le développement d'un carcinome hépatocellulaire (CHC)(Anstee and Day 2013).

Le spectre de désordres hépatiques défini au cours de la NAFLD a tout d'abord été décrit comme un modèle en deux étapes, appelé « two hits hypothesis »(Day and James 1998). Le premier « hit » de cette séquence est caractérisé par un désordre lié à une accumulation pathologique de lipides dans les hépatocytes : c'est la stéatose hépatique non alcoolique (Non Alcoholic Fatty liver - NAFL). Le second « hit » de cette séquence induit l'installation de la NASH. Celle-ci est associée à une inflammation chronique, au stress oxydant, à des dommages à l'ADN, à la mort cellulaire et au développement d'une fibrose (Caballero, Fernandez et al. 2009). Ce modèle place le foie en position centrale, en tant que seul organe impliqué dans le développement des NAFLD, or des études récentes mettent clairement en évidence l'implication d'autres organes tels que le tissu adipeux, les muscles et les intestins. Le spectre de désordres hépatiques se développerait plutôt selon un modèle multi-étapes appelé « multiple hits hypothesis »(Tilg and Moschen 2010, Haas, Francque et al. 2015, Buzzetti, Pinzani et al. 2016)

#### **1. Mise en place de la stéatose hépatique**

La stéatose hépatique est définie par une accumulation de divers lipides, principalement des triglycérides, dans le cytoplasme d'au moins 5% des hépatocytes(Burt, Mutton et al. 1998). C'est une atteinte bénigne pour le foie puisqu'il sera toujours capable d'assurer l'ensemble de ses fonctions, et réversible lorsque des habitudes alimentaires sont mises en

oeuvres(Angulo 2002). La stéatose hépatique se développe suite à une augmentation des flux de lipides dans l'organisme, ce qui induit un déséquilibre des balances import/export et synthèse/dégradation. En conséquence, ceci entraîne un stockage important des acides gras sous forme de triglycérides au niveau des hépatocytes, sous forme de gouttelettes lipidiques. Il a été démontré, chez les patients NAFLD, que 60% des acides gras proviennent de la lipolyse du tissu adipeux, 25% proviennent de la lipogénèse hépatique et 15% proviennent de l'alimentation (Donnelly, Smith et al. 2005). Le développement de la stéatose hépatique est fréquemment associé à un état d'insulino-résistance périphérique(Bugianesi, McCullough et al. 2005, Yu, Shen et al. 2013).

### a) Mécanismes menant à la stéatose hépatique

#### ➤ Absorption des acides gras

L'absorption des acides gras dans le foie contribue à l'homéostasie du taux de triglycérides hépatique, mais aussi au développement des NAFLD. Les acides gras non estérifiés peuvent provenir de la lipolyse du tissu adipeux et de l'hydrolyse des chylomicrons (lipoprotéine composée de lipides en provenance du tractus intestinal). Après leur entrée dans la cellule, ces acides gras sont rapidement estérifiés, puis stockés dans les hépatocytes sous forme de gouttelettes lipidiques. La résistance à l'insuline du tissu adipeux entraîne le développement de la stéatose hépatique, puisque la lipolyse ne sera plus contrôlée et augmentera donc, le flux d'acides gras non estérifiés à destination des hépatocytes (Bradbury 2006, Postic and Girard 2008, Kawano and Cohen 2013).

#### ➤ Lipogénèse de novo

La lipogénèse *de novo* est initiée à partir d'une molécule de glucose qui est glycolysée puis oxydée pour former une molécule d'acétyl-CoA. Cette dernière sera ensuite convertie en malonyl-CoA par l'Acétyl-CoA Carboxylase (ACC). La formation d'acide palmitique est ensuite catalysée par la Fatty Acid Synthase (FAS), à partir de l'acétyl-CoA et du malonyl-CoA. L'Acide palmitique ainsi formé est transformé, par la Stearoyl-CoA Desaturase 1 (SCD1), en un acide gras mono-insaturé essentiel à la formation de triglycérides. Cet acide gras mono-insaturé subit des réactions enzymatiques qui conduisent à la formation de diacylgérol. La catalyse du diacylgérol par l'Acyl-CoA Diacylgérol Acyltransferase (DGAT) forme une molécule de triglycérides. Les triglycérides seront par la suite inclus dans des gouttelettes lipidiques, entourées, entre autres par les protéines de la famille des périlipines, protéines qui régulent les mécanismes de stockage et de mobilisation des

triglycérides (Fujii, Ikura et al. 2009). Des données récentes suggèrent que ces molécules seraient impliquées dans le développement des NAFLD (Ikura and Caldwell 2015).

La lipogenèse est régulée par trois principaux facteurs de transcription : la Sterol Regulatory Element-Binding Protein (SREBP) -1c, la Carbohydrate Response Element-Binding Protein (ChREBP) et la X-Box Binding Protein (XBP) -1, en réponse respectivement à l'insuline, au glucose et aux Unfolded Protein Response (UPR) produits suite à un stress du réticulum endoplasmique (Postic and Girard 2008, Ferre and Foufelle 2010, Tilg and Moschen 2010). Par conséquent, une insulino-résistance induit l'expression de ces facteurs de transcription et donc une augmentation de la lipogenèse dans l'hépatocyte, menant au développement d'une stéatose hépatique.

#### ➤ Oxydation des acides gras

L'oxydation des acides gras est essentielle à la production d'Adénosine Tri-Phosphate (ATP), ainsi qu'au maintien du taux de triglycérides hépatiques. La  $\beta$ -oxydation des acides gras a lieu principalement dans la matrice mitochondriale, pour permettre la formation, à partir d'un acide gras, d'une molécule d'acétyl-CoA. L'acide gras est tout d'abord converti en acyl-CoA grâce à l'Acyl-CoA Synthetase (ACS). L'acyl-CoA est ensuite transformé en acyl-carnitine par la Carnitine PalmitoylTransferase (CPT)-1, afin d'être transloqué dans le cytoplasme de la mitochondrie par l'intermédiaire de la Carnitine Acylcarnitine Translocase (CAT). L'acyl-carnitine est ensuite reconverti en acyl-CoA par CPT2 (Violante, Ijlst et al. 2013). Dans la matrice mitochondriale, l'acyl-CoA est séquentiellement dégradé en acétyl-CoA par des tours successifs de  $\beta$ -oxydation (aussi appelés hélices de Lynen)(Eaton, Zaitoun et al. 1996). Les acétyl-CoA alors formés pourront alors soit être oxydés par le cycle de Krebs, soit être convertis en corps cétoniques si ceux-ci sont présents en excès dans la cellule. Un défaut de  $\beta$ -oxydation peut être retrouvé en condition d'insulino-résistance : une hyperinsulinémie allume le facteur de transcription SREBP1c, qui active ACC et qui favorise donc la formation de malonyl-CoA, décrit comme étant un inhibiteur de CPT1 (McGarry and Foster 1980). Ainsi, l'insuline, à travers la formation du malonyl-CoA va inhiber la  $\beta$ -oxydation en bloquant l'entrée des acides gras dans la matrice mitochondriale (Ferre and Foufelle 2010). Cependant, le rôle de la  $\beta$ -oxydation dans les NAFLD reste très controversée. En effet, alors que certaines études suggèrent une baisse de l'oxydation des acides gras (Sanyal, Campbell-Sargent et al. 2001), d'autres démontrent une augmentation qui ne serait pas suffisante pour compenser l'afflux massif d'acides gras dans les hépatocytes (Sunny, Parks et al. 2011, Haas, Francque et al. 2015, Koliaki, Szendroedi et al. 2015).

L'augmentation de cette  $\beta$ -oxydation s'accompagne de la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) (Begrliche, Massart et al. 2013, Kawano and Cohen 2013).

#### ➤ Sécrétion des VLDL

La sécrétion de VLDL est le moyen pour le foie d'exporter ses lipides vers les tissus périphériques (tissu adipeux, muscle squelettique et muscle cardiaque) (Pessayre and Fromenty 2005). Les particules de VLDL sont composées principalement de triglycérides (55%), de phospholipides (18%), et de cholestérol (19%). Chaque particule de VLDL est stabilisée par une molécule d'apolipoprotéine (Apo)-B100 qui assure la cohésion des lipoprotéines et qui contrôle leur métabolisme (Hussain, Shi et al. 2003). L'assemblage des lipoprotéines sur l'ApoB100 est facilité par la Microsomal Triglyceride transfer Protein (MTP). La MTP est une protéine de transfert de lipides (majoritairement des esters de triglycérides ou de cholestérol) qui stabilise l'ApoB100 lors de son entrée dans le RE. Lorsque les particules de VLDL sont formées, elles sont adressées à l'appareil de Golgi où aura lieu leur maturation. Ces particules seront ensuite sécrétées dans la circulation par exocytose (Tiwari and Siddiqi 2012). Une altération de synthèse, de l'assemblage et/ou de la sécrétion des particules de VLDL pourra conduire à une accumulation de lipides hépatiques : des patients qui présentent une mutation dans le gène codant pour ApoB100 ou MTP développent une stéatose hépatique (Berriot-Varoqueaux, Aggerbeck et al. 2000, Tanoli, Yue et al. 2004). La résistance à l'insuline joue un rôle important, puisque, à travers la lipolyse non régulée du tissu adipeux et la lipogenèse *de novo*, elle augmente le taux de lipides disponible dans l'hépatocyte et ainsi favorise l'assemblage des particules de VLDL (Begrliche, Massart et al. 2013). Cependant, la sécrétion d'ApoB100 n'étant pas augmentée, ceci limite la capacité d'export des triglycérides hépatiques. De plus, l'augmentation de la production et de la sécrétion des particules de VLDL ne parvient pas à compenser la surproduction de triglycérides dont la concentration reste très élevée (Fujita, Nozaki et al. 2009). L'exposition prolongée du foie à des acides gras non estérifiés pourra induire un stress du RE, qui impacterait directement l'export des particules de VLDL par la dégradation de l'ApoB100. Ce stress du RE pourra alors activer le facteur de transcription XBP1, et les gènes de la lipogenèse, et ainsi amplifier l'accumulation de lipides hépatiques (Lee, Scapa et al. 2008).

#### **b) Rôle des triglycérides**

L'accumulation de triglycérides dans les hépatocytes est à l'origine du développement de la stéatose hépatique. Cependant, des études suggèrent que cette accumulation lipidique aurait

plutôt un rôle protecteur que délétère (Haas, Francque et al. 2015, Buzzetti, Pinzani et al. 2016). En effet, lorsque la synthèse de triglycérides est inhibée par le blocage de l'enzyme DGAT, la réponse inflammatoire et la fibrose hépatique sont exacerbées chez des animaux obèses (Yamaguchi, Yang et al. 2007). De la même manière, lorsque SCD1 est inhibée, chez des animaux où la lipogenèse *de novo* est favorisée par un régime riche en sucres, il a été démontré que la diminution de l'accumulation de triglycérides hépatiques s'accompagnait de sévères dommages au tissu hépatique (Flowers, Groen et al. 2006). Ces résultats suggèrent que l'accumulation de triglycérides est en fait un mécanisme qui prévient l'accumulation de précurseurs lipidiques des triglycérides, toxiques pour les hépatocytes comme par exemple les diacylglycérols (Neuschwander-Tetri 2010).

### c) Rôle de la résistance à l'insuline

#### ➤ Implication de l'insuline dans la lipogenèse

L'insuline est une hormone hypoglycémisante sécrétée par les cellules  $\beta$  des îlots de Langerhans du pancréas, dans la circulation portale, en réponse à une augmentation du taux de glucose sanguin. La résistance à l'insuline est définie par une diminution des effets de l'insuline sur les tissus cibles tels que le tissu adipeux, le muscle squelettique et le foie. Elle se manifeste, notamment, par une production de glucose hépatique non régulée, entraînant une hyperglycémie en période de jeûne (Girard 1995). Dans un premier temps, avant que l'hyperglycémie ne s'installe, le pancréas tente de compenser l'excès de glucose sanguin par l'augmentation de la sécrétion d'insuline. Lorsque le pancréas n'est plus capable de maintenir une glycémie normale, il se développe alors une hyperglycémie et une hyperinsulinémie constante qui caractérisent l'insulino-résistance. Au niveau hépatique, celle-ci se caractérise par un déséquilibre de la balance entre absorption/synthèse et dégradation des acides gras. Les triglycérides du tissu adipeux, dans un état physiologique, sont mobilisés et hydrolysés afin de fournir de l'énergie aux autres tissus lorsque cela est nécessaire. L'hydrolyse des triglycérides est principalement régulée par l'Hormone Sensitive Lipase (HSL). Au cours de l'insulino-résistance du tissu adipeux, l'activité de la HSL n'est plus régulée, ce qui entraîne une libération non contrôlée d'acides gras non estérifiés à destination du foie (Lewis, Carpentier et al. 2002, Postic and Girard 2008). Au niveau hépatique, la résistance à l'insuline favorise la lipogenèse *de novo*. En effet, l'hyperinsulinémie et l'hyperglycémie favorisent, respectivement, la transcription et l'activation de SREBP1c et ChREBP, qui agissent en synergie dans le foie (Dentin, Pegorier et al. 2004). Ceci induit la transcription des enzymes FAS, ACC et SCD1 directement impliquées dans la lipogenèse, et entraînent dans le même

temps un défaut de  $\beta$ -oxydation des acides gras (Ferre and Foufelle 2010). La résistance à l'insuline est donc un facteur clé dans le développement de la stéatose hépatique.

### ➤ Rôle des hépatokines

Les organokines sont des protéines produites et sécrétées de manière organe spécifique, capables d'influencer le métabolisme énergétique. De la même manière que le tissu adipeux (adipokines) et le muscle squelettique (myokines), le foie est capable de sécréter des protéines dans la circulation appelées hépatokines. Elles jouent un rôle ambivalent dans le développement de la stéatose hépatique puisque certaines la favorisent à travers le développement de la résistance à l'insuline, tandis que d'autres seront protectrices (Stefan and Haring 2013). De manière intéressante, des taux élevés de Fetuin-A, et de Fibroblast Growth Factor (FGF)-21 (Dushay, Chui et al. 2010) sont retrouvés dans la circulation des patients NAFLD. La Fetuin-A est une hépatokine qui favorise le développement de la stéatose hépatique en induisant une résistance à l'insuline (Mathews, Singh et al. 2002, Pal, Dasgupta et al. 2012), tandis que le FGF-21 va avoir des effets protecteurs. En effet, il est décrit dans la littérature que FGF-21 est capable de réduire la lipogenèse *de novo* par inhibition de SREBP1c, ainsi que d'augmenter la  $\beta$ -oxydation des acides gras (Gimeno and Moller 2014).

## 2. De la stéatose à la stéato-hépatite non alcoolique

La stéatose hépatique est une affection bénigne réversible, qui peut toutefois s'aggraver avec la mise en place d'un processus de nécro-inflammation du tissu hépatique : on parle alors de stéato-hépatite non alcoolique (NASH). Cette transition NAFL/NASH est sous la dépendance de multiples facteurs tels que la formation de métabolites lipotoxiques, la production non contrôlée de ROS, un stress du RE, ou encore une réponse inflammatoire exacerbée menant au développement d'une fibrose hépatique (Cusi 2009, Neuschwander-Tetri 2010).

### a) *La lipotoxicité hépatique*

Le concept de la lipotoxicité hépatique est défini par l'exposition prolongée des hépatocytes à certains types d'acides gras pouvant causer une toxicité directe ou indirecte pour la cellule, à travers l'activation de réponses pro-inflammatoires et pro-fibrotiques, favorisant le développement de la NASH (Neuschwander-Tetri 2010). De nombreuses molécules peuvent activer ce mécanisme de lipotoxicité comme les acides gras non estérifiés et leurs dérivés comme le diacylgérol (Kumashiro, Erion et al. 2011), les céramides (Chaurasia and Summers 2015) et le cholestérol, dont l'implication dans la transition NAFL/NASH

suscite l'intérêt de recherches récentes (Musso, Gambino et al. 2013, Arguello, Balboa et al. 2015). Ces lipides toxiques sont capables d'altérer les fonctions des organites (mitochondries, RE et gouttelettes lipidiques), d'activer une réponse inflammatoire et d'induire une mort cellulaire (Tabas 2002, Neuschwander-Tetri 2010).

➤ Implication du cholestérol dans la lipotoxicité

Le foie, parmi ses nombreuses fonctions métabolique, contribue au maintien de l'homéostasie du cholestérol dans l'organisme. De nombreux mécanismes sont mis en place dans les hépatocytes pour réguler l'afflux de cholestérol en provenance de l'alimentation, afin d'éviter une accumulation de cholestérol libre qui est toxique pour l'organisme. Le cholestérol en provenance du tractus intestinal est estérifié, puis stocké dans les gouttelettes lipidiques grâce à l'acétyl-coenzyme A acétyltransferase 2 (ACAT-2), la synthèse de cholestérol est inhibée par la rétention du facteur de transcription SREBP-2 dans le RE et la dégradation de l'HMG-CoA reductase (HMGCR), tandis que son élimination dans les acides biliaires est augmentée par l'activation des récepteurs nucléaires Liver X Receptor (LXR) et Farnesoid X Receptor (FXR). Brièvement, la synthèse des acides biliaires est régulée par les enzymes Cyp7a1 (cholestérol 7 $\alpha$ -hydrolase) et Cyp8b1, qui contrôlent la formation d'acides choliques à partir du cholestérol. Une fois la synthétisés, les acides biliaires sont excrétés à l'aide de transporteurs spécifiques ABC (ATP Binding Cassette). L'export des acides biliaires est principalement contrôlée par le transporteur ABCB11/BSEP (Bile Salt Export Protein) impliqué dans l'export des acides biliaires, ABCG5/ABCG8, impliqués dans l'export de cholestérol et la protéine à activité flippase ABCB4 impliqué dans l'export de phosphatidylcholine (Musso, Gambino et al. 2013).

Au cours des NAFLD, il a été rapporté de nombreux dysfonctionnements dans ces mécanismes de régulation du métabolisme du cholestérol, se manifestant par une augmentation du taux de cholestérol libre et conduisant à une lipotoxicité hépatique (Min, Kapoor et al. 2012, Musso, Gambino et al. 2013, Ioannou 2016). La lipotoxicité médiée par le cholestérol libre fait partie des mécanismes favorisant le développement et l'installation de la NASH. En effet, des études de lipidomique réalisées sur des cohortes de patients, ont montré une augmentation du taux cholestérol libre, sans modification du taux d'acides gras non estérifiés chez des patients atteints de NASH (Puri, Baillie et al. 2007, Caballero, Fernandez et al. 2009). D'autre part, il a été montré, dans des modèles murins soumis à un régime riche en gras, couplé à un régime riche en cholestérol, qu'une accumulation de cholestérol libre était associée à la gravité de la stéato-hépatite (Van Rooyen, Larter et al. 2011, Savard, Tartaglione et al. 2013). A l'inverse, lorsque des drogues hypocholestérolémiantes ou des

agonistes de la voie d'élimination du cholestérol sous forme d'acides biliaires sont administrés chez des animaux présentant une NASH, il y a une résolution partielle de la NASH sans modification du taux de triglycérides hépatiques, ce qui suggère que le cholestérol libre est à l'origine de la réponse inflammatoire observée dans la NASH (Wouters, van Bilsen et al. 2010, Ioannou, Van Rooyen et al. 2015). Il est intéressant de souligner la présence de cristaux de cholestérol dans les gouttelettes lipidiques des foies stéatosiques de souris et de patients atteints de NASH (Ioannou, Haigh et al. 2013, Hendrikx, Walenbergh et al. 2014, Arguello, Balboa et al. 2015). Les gouttelettes lipidiques sont constituées d'un noyau hydrophobe essentiellement constitué de triglycérides et de cholestérol estérifié, entouré par une monocouche de phospholipides et de protéines de la famille des périlipines. Bien que ces gouttelettes aient été longtemps considérées comme de simples unités de stockage de lipides cellulaires, elles sont maintenant considérées comme des organites intracellulaires ayant de véritables fonctions dans le métabolisme énergétique en étroite interaction avec les mitochondries et le RE (Greenberg and Coleman 2011, Mashek, Khan et al. 2015). La plupart des cellules de l'organisme ont des gouttelettes lipidiques, mais seuls les hépatocytes et les adipocytes ont la capacité de s'adapter, de moduler leur nombre et leur taille en réponse à une surcharge métabolique. La présence de cholestérol libre dans la membrane phospholipidique des gouttelettes est capable de moduler leurs propriétés intrinsèques (Thiam, Farese et al. 2013). D'autre part, bien qu'il soit considéré que ces gouttelettes lipidiques contiennent majoritairement des triglycérides, il est rapporté qu'un certain type de gouttelettes stockerait préférentiellement du cholestérol estérifié, avec un profil d'expression de protéines de la famille des périlipines modifié (Hsieh, Lee et al. 2012). Dans un contexte de NASH, la cristallisation du cholestérol dans les gouttelettes lipidiques a lieu sur le pourtour de la membrane qui les entoure, ce qui semblerait être la conséquence d'une forte concentration de cholestérol libre dans cette membrane phospholipidique. Ces cristaux de cholestérol sont capables d'induire la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires par les hépatocytes telles que l'IL-1 $\beta$ , favorisant la mort cellulaire des hépatocytes (Ioannou 2016). Indépendamment de sa cristallisation dans les hépatocytes, le cholestérol est un véritable interrupteur de la réponse immunitaire, puisque son accumulation dans les cellules immunitaires est capable de les activer, à travers l'inflammasome NOD-, LRR-, and pyrin domain-containing 3 (NLRP3) (Tall and Yvan-Charvet 2015).

#### ➤ Altérations de la fonction mitochondriale

La mitochondrie joue un rôle essentiel dans les fonctions métaboliques du foie. Elle est responsable de la production d'énergie et de la respiration cellulaire, source majeure de

production de ROS. Des altérations fonctionnelles et structurales ont été décrites dans le développement des NAFLD. L'accumulation excessive d'acides gras dans les hépatocytes induit des altérations de la chaîne respiratoire mitochondriale et un défaut de  $\beta$ -oxydation des acides gras, ce qui entraîne la production de métabolites toxiques et la mise en place d'un stress oxydatif par une augmentation de la production de ROS (Begriche, Igoudjil et al. 2006, Begriche, Massart et al. 2013). La sécrétion de ces molécules est délétère : ces molécules sont capables d'activer une réponse inflammatoire qui mènera au processus de nécro-inflammation du tissu hépatique (Cusi 2009). Par ailleurs, au cours de la stéatose hépatique, le cholestérol libre est capable d'altérer les fonctions mitochondriales en diminuant le taux de glutathion intra-mitochondrial. Le glutathion est un tripeptide formé par la condensation d'acide glutamique, de cystéine et de glycine. Sous sa forme réduite (GSH) le glutathion est l'anti-oxydant majeur des cellules, sa présence est essentielle dans le contrôle de la production de ROS notamment en réponse à des stimuli de mort cellulaire tels que le TNF- $\alpha$  ou Fas Ligand (Fas L). En condition d'excès de cholestérol libre, le transport de GSH dans la matrice mitochondriale est inhibé, ce qui induit une augmentation de la production de ROS, ainsi que l'augmentation de la peroxydation des acides gras. Les hépatocytes seront alors plus sensibles à la nécrose et à l'apoptose, avec une réponse pro-inflammatoire qui participe à l'installation de la NASH (Mari, Caballero et al. 2006).

➤ Stress du réticulum endoplasmique

Le réticulum endoplasmique joue un rôle vital dans le maintien de l'homéostasie métabolique. Il est le lieu des modifications post-traductionnelles des protéines natives pour leur conférer la structure conformationnelle adaptée. Il permet également la synthèse de phospholipides, le stockage des ions calcium participant à la signalisation cellulaire, ainsi que la détoxification par des enzymes telles que le cytochrome P450. Le stress du RE se caractérise par une modification de la composition lipidique dans le RE, ainsi que l'inhibition des pompes à calcium ATPase dépendantes (SERCA) (Fu, Yang et al. 2011). Lorsque les fonctions du RE sont altérées, il y a la mise en place d'un stress du RE dont la réponse adaptative est la réponse UPR. Dans les NAFLD, la réponse UPR peut être induite par une hyperglycémie, une hypercholestérolémie, un défaut de production d'ATP ou encore un stress oxydant générés par des altérations des fonctions mitochondriales (Seki, Kitada et al. 2005). Les UPR sont impliqués dans la régulation de la lipogenèse, et le RE est directement impliqué dans la synthèse des acides gras et le métabolisme du cholestérol. En effet, les facteurs de transcription de la famille SREBP sont résidents dans la lumière du RE. Ces protéines sont essentielles à la régulation des gènes impliqués dans le métabolisme du

cholestérol (SREBP1a et SREBP2) ou de la synthèse de lipides (SREBP1c), et peuvent être activées suite à un stress du RE (Gregor and Hotamisligil 2007). Dans les hépatocytes, la réponse UPR active le facteur de transcription XBP1, capable d'induire l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme des lipides comme SCD1, ACC et DGAT (Hotamisligil 2010). De manière intéressante, XBP1 est directement impliqué dans la pathogenèse des NAFLD, puisqu'il a été décrit que des souris XBP1<sup>-/-</sup> soumises à un régime riche en carbohydrates (régime induisant, à long terme, le développement d'une stéatose) ne développent pas de stéatose hépatique (Lee, Scapa et al. 2008). D'autre part, XBP1 est également un activateur de la réponse inflammatoire, par l'activation des voies de signalisations JNK et NF-κB (Hotamisligil 2010). Par conséquent, une exposition prolongée de la cellule au stress du RE favorise une augmentation du stress oxydant, les dommages tissulaires ainsi qu'une réponse pro-inflammatoire impliqués dans la progression de la NASH (Nakagawa, Umemura et al. 2014).

### **b) La réponse inflammatoire**

Les maladies hépatiques chroniques sont caractérisées par une mort cellulaire accrue accompagnée d'une réponse inflammatoire exacerbée pouvant mener au développement d'une fibrose (Seki and Schwabe 2015). Au delà d'une stéatose hépatique plus ou moins prononcée, ces caractéristiques sont toujours retrouvées dans la NASH (Tilg and Moschen 2010, Haas, Francque et al. 2015, Buzzetti, Pinzani et al. 2016). La réponse inflammatoire est en réalité un mécanisme de défense pour permettre à la fois l'élimination des cellules mortes et la régénération du tissu hépatique alors endommagé, pour restaurer son architecture et ses fonctions. Cependant lorsque l'inflammation ne parvient plus à contrôler les dommages causés aux hépatocytes, la mort hépatocytaire devient chronique. Par conséquent, une réponse inflammatoire chronique se met en place, conduisant à des dommages irréversibles du parenchyme hépatique (Seki and Schwabe 2015). La mise en place de cette inflammation chronique n'est pas uniquement liée à la mort des hépatocytes. En effet, des études suggèrent une réelle implication de l'activité sécrétoire du tissu adipeux et du microbiote intestinal dans la mise en place de cette réponse inflammatoire (Tilg and Moschen 2010, Buzzetti, Pinzani et al. 2016).

#### ➤ Inflammation du tissu hépatique

Les cellules de Kupffer ont longtemps été considérées comme les principales cellules responsables de l'inflammation dans les NASH. En réalité, de nombreuses autres cellules du

système immunitaire inné ou adaptatif, ainsi que les cellules du parenchyme hépatique sont impliquées dans cette réponse inflammatoire chronique (Haas, Francque et al. 2015).

**L'inflammasome** NLRP3 est le premier senseur du stress métabolique dans les hépatocytes et les cellules de Kupffer. En effet, il est capable de s'activer en réponse à un excès d'acides gras non estérifiés, à du stress oxydant, et à des métabolites toxiques. Son activation induit la production des cytokines pro-inflammatoires IL-18 et IL-1 $\beta$ , par l'intermédiaire de la caspase 1 (Schroder, Zhou et al. 2010, Tschopp and Schroder 2010). L'inflammasome NLRP3 semble jouer un rôle essentiel dans la transition NAFL/NASH, puisque sa délétion dans des modèles murins soumis à des régimes inducteur de stéato-hépatite, empêche l'apparition de la NASH. Chez l'homme, les protéines associées à l'inflammasome NLRP3 sont augmentées chez les patients NASH, comparativement aux patients NAFL (Wree, McGeough et al. 2014). Par ailleurs, l'activation de l'inflammasome NLRP3 induit une mort cellulaire des hépatocytes par pyroptose, ce qui contribue à amplifier une réponse inflammatoire en faveur du développement d'une fibrose hépatique (Wree, Eguchi et al. 2014).

**Les neutrophiles** font partie des cellules activées par l'inflammasome. Leur rôle dans les maladies hépatiques chroniques est peu clair. Toutefois, des études récentes suggèrent leur implication dans la NASH : les neutrophiles contribuent à aggraver l'inflammation par la production de ROS, d'IL-1 et de TNF- $\alpha$ , et par le recrutement de macrophages et l'activation des cellules de Kupffer (Xu, Huang et al. 2014). **Les cellules de Kupffer** sont capables de s'activer en réponse à de nombreux stimuli associés à un stress métabolique : le stress oxydant, les acides gras non estérifiés et leurs dérivés lipotoxiques et le cholestérol. Conjointement à leur exposition permanente au LPS en provenance du tractus intestinal, l'ensemble de ces signaux contribue à induire une réponse inflammatoire régulée, entre autres par le TLR4, le TLR2 et l'inflammasome, menant à la production de TNF- $\alpha$  et d'IL-1 $\beta$ . (Heymann and Tacke 2016). Le TNF- $\alpha$  joue un rôle primordial dans l'initiation et le maintien de la réponse inflammatoire dans la NASH. En effet, la fixation du TNF- $\alpha$  à son récepteur induit l'activation de la voie de signalisation NF- $\kappa$ B. Cette voie de signalisation est impliquée dans l'inflammation chronique décrite dans des modèles murins de NAFLD (Cai, Yuan et al. 2005) et chez des patients NASH (Ribeiro, Cortez-Pinto et al. 2004). L'activation de la voie NF- $\kappa$ B amplifie la réponse inflammatoire par la production de nombreuses cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 et de TNF- $\alpha$ , et par l'induction de l'expression des molécules d'adhérence Inter-Cellular Adhesion Molecule (ICAM)-1 et Vascular Cell Adhesion Molecule (VCAM)-1 qui favorise le recrutement des

lymphocytes (Tak and Firestein 2001, Tomita, Tamiya et al. 2006). Les cellules de Kupffer contribuent également au recrutement de macrophages périphériques par l'expression de la molécule CCL2 (Baeck, Wehr et al. 2012, Miura, Yang et al. 2012). Par ailleurs, les cellules de Kupffer et les macrophages recrutés, participent au développement de la fibrose hépatique par la sécrétion de TGF- $\beta$ , cytokine pro-fibrotique majeure (Bieghs and Trautwein 2013).

**Les cellules dendritiques** sont d'importantes cellules immunorégulatrices dans la NASH, puisque leur déplétion est corrélée à la sévérité des lésions tissulaires et à l'apparition d'une fibrose hépatique. Elles sont capables de sécréter de l'IL-10 mais aussi des cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-6 et le TNF- $\alpha$ . Dans la NASH, il a été rapporté que ces cellules favorisent une activation préférencielle des lymphocytes T CD4+, avec une diminution du nombre de lymphocytes T régulateurs (Henning, Graffeo et al. 2013). **Les lymphocytes T** sont ainsi impliqués dans la NASH. Des études récentes suggèrent une activation délétère des lymphocytes T CD4+ dans des modèles de souris où la NASH est induite par des régimes alimentaires (Chatzigeorgiou, Chung et al. 2014, Sutti, Jindal et al. 2014). Par ailleurs, une amplification du nombre de lymphocytes T CD4+ polarisés Th17 est étroitement associée à la NASH. Ces cellules pro-inflammatoires produisent de l'IL-17 qui, en synergie avec les acides gras, induit la production d'IL-6 par les hépatocytes (Tang, Bian et al. 2011). D'autre part, l'IL-17 serait impliquée dans le développement de la fibrose hépatique (Meng, Wang et al. 2012). Les lymphocytes T CD8+ jouent également un rôle majeur dans les NAFLD. Il a été très récemment démontré que ces cellules, avec les NKT favorisaient le développement de la NASH et sa progression vers un CHC (Wolf, Adili et al. 2014). **Les lymphocytes NK et NKT** sont, avec les cellules de Kupffer, les effecteurs majeurs du système immunitaire hépatique. Les cellules NK sont principalement des effecteurs cytotoxiques et semblent jouer un rôle protecteur pour le parenchyme hépatique. En réponse à une activation du TLR9, les cellules NK auraient des effets anti-fibrotiques par la destruction des HSC activés (Abu-Tair, Axelrod et al. 2013). En revanche, les cellules NKT sont des cellules pro-inflammatoires, favorisant le développement de la fibrose hépatique dans le contexte des NAFLD (Wehr, Baeck et al. 2013). Chez l'homme, une accumulation de NKT hépatique est corrélée à la sévérité de la NASH (Syn, Oo et al. 2010). En effet, les NKT contribuent à aggraver les lésions hépatiques par la sécrétion d'IL-4, d'IFN- $\gamma$  et sont capables d'induire l'apoptose des hépatocytes par le récepteur Fas (Gao, Radaeva et al. 2009). De plus, il a été récemment démontré, à l'aide de modèles murins soumis à un régime permettant de récapituler toutes les étapes de la NAFLD chez l'homme, un rôle des NKT dans l'augmentation de l'absorption des acides gras par les hépatocytes, à travers la sécrétion de la cytokine LIGHT (cytokine de la

famille du TNF- $\alpha$ ). En association avec les lymphocytes T CD8+, les cellules NKT contribuent au développement de la stéato-hépatite et du CHC, par l'activation de la voie NF- $\kappa$ B. De façon intéressante, l'augmentation de LIGHT est corrélée à la sévérité de la NASH chez des patients (Wolf, Adili et al. 2014).

➤ Implication du tissu adipeux

Le tissu adipeux n'est plus considéré comme un simple organe de stockage de lipides, mais comme un tissu ayant une véritable fonction endocrine par la sécrétion d'hormones (appelées adipokines) comme la leptine ou l'adiponectine, et une fonction immunitaire (Tilg and Moschen 2010). La leptine est une hormone digestive peptidique qui régule les réserves de graisses de l'organisme et qui contrôle l'appétit. Elle exerce des fonctions pro-inflammatoires qui préviennent toute accumulation de lipides dans les tissus non adipeux, et plus particulièrement dans le foie par la diminution de l'expression de SREBP-1 (Kakuma, Lee et al. 2000). Des études suggèrent un rôle de la leptine dans la fibrogenèse hépatique, en induisant la production de TGF- $\beta$  par les cellules de Kupffer (Wang, Leclercq et al. 2009). L'adiponectine exerce des fonctions anti-inflammatoires, diminue l'oxydation des acides gras et inhibe la gluconéogenèse hépatique. Ses effets anti-inflammatoires sont médiés par le blocage de la voie NF- $\kappa$ B, ainsi que l'inhibition de la sécrétion de l'IL-6 et de TNF- $\alpha$  dans le tissu adipeux. Chez les patients obèses, les niveaux de leptine sont augmentés avec une diminution des taux d'adiponectine, suggérant une implication de ces adipocytokines dans les NAFLD (Tilg 2010). Par ailleurs, le tissu adipeux assure le maintien d'une inflammation de bas grade par la production d'IL-6 et de TNF- $\alpha$ , associée à une infiltration de macrophages. Cette inflammation contribue au maintien de l'homéostasie du programme métabolique. Toutefois, l'augmentation de ces cytokines, ainsi que l'activation des macrophages sont associés à la sévérité de la NASH, chez les patients (du Plessis, van Pelt et al. 2015). De manière intéressante, au cours de ces désordres métaboliques, dans le tissu adipeux et le tissu hépatique, il y a une polarisation des macrophages de type M2 dits « anti-inflammatoires » vers des macrophages de type M1 dits « pro-inflammatoires ». Ces macrophages M1 vont contribuer à la sévérité de la NASH en promouvant des lésions hépatocytaires (Bhargava and Lee 2012, Bieghs and Trautwein 2013).

➤ Implication du microbiote intestinal

Le microbiote intestinal, anciennement appelé flore intestinale est l'ensemble des micro-organismes logeant dans le tractus intestinal. Il est aujourd'hui admis que des modifications du microbiote intestinal sont impliquées dans la pathogenèse et la progression des NAFLD.

Des modifications métaboliques sont capables de modifier la flore intestinale. Ces modifications induisent une augmentation de la perméabilité gastro-intestinale ayant pour conséquence une augmentation du taux d'endotoxines dans la circulation portale, et donc une activation des réponses immunitaires intestinales, adipeuses et hépatiques : c'est le concept « d'infection métabolique » (Moschen, Kaser et al. 2013). L'épithélium intestinal porte à sa surface les récepteurs TLRs capables de répondre à des lipides nutritionnels comme les acides gras, mais également à des endotoxines bactériennes, et d'induire une réponse inflammatoire adaptative. Une étude menée sur le TLR5 a permis de souligner l'importance du microbiote intestinal dans les maladies métaboliques. Il a été rapporté que la délétion de TLR5 se manifestait par une obésité, une stéatose hépatique et une inflammation exacerbée, associées à d'importantes modifications du microbiote. De manière intéressante, le transfert de ce microbiote TLR5<sup>-/-</sup> chez des individus sains induit le développement de la pathologie, ce qui démontre clairement l'implication du microbiote intestinal dans le syndrome métabolique (Vijay-Kumar, Aitken et al. 2010). D'autre part, une étude plus récente a démontré un effet protecteur de l'inflammasome et de l'IL-18 dans la progression NAFLD/NASH par des modifications de la flore intestinale. En effet, une déficience en inflammasome NLRP3 ou en IL-18, dans un contexte où la NASH est induite par un régime alimentaire dans des modèles murins, entraîne une augmentation du flux d'agonistes des TLR4 et TLR9 dans la circulation portale, et favorise en conséquence production massive de TNF- $\alpha$  dans le parenchyme hépatique (Heno-Mejia, Elinav et al. 2012). Ces études démontrent que le microbiote intestinal peut être considéré comme un véritable organe métabolique régulant la réponse inflammatoire dans les maladies hépatiques (Tilg and Moschen 2010, Buzzetti, Pinzani et al. 2016).

### **c) La fibrose hépatique**

La mort des hépatocytes et l'inflammation sont deux caractéristiques de la NASH, capable d'induire le développement d'une fibrose hépatique. La fibrose se définit par le remplacement progressif des hépatocytes par du tissu cicatriciel constitué de collagène de type I et III, ainsi que d'autres composants tels que la fibronectine et la laminine. La matrice extracellulaire normale qui se trouve dans l'espace entre les hépatocytes et les cellules endothéliales subit des modifications qui aboutissent à la formation du tissu fibrotique. Dans le foie, la fibrogenèse implique de nombreuses cellules, dont les HSCs qui sont les acteurs majeurs de ce processus. Les HSCs sont activés face à de nombreux signaux cytokiniques générés par la mort des hépatocytes et l'inflammation hépatique (Seki and Schwabe 2015). Ils

sécrètent des composants de la matrice extracellulaire comme le collagène et des enzymes protéolytiques qui dégradent la matrice extracellulaire existante. (Friedman 2008).

L'inflammation et la mort des hépatocytes sont des activateurs majeurs de la fibrogenèse. Les macrophages, et plus particulièrement les cellules de Kupffer, jouent un rôle essentiel dans l'activation des HSCs par la sécrétion de cytokines pro-fibrosantes (plus particulièrement du TGF- $\beta$ ) et la production de ROS. Ils induisent la transformation des HSCs en myofibroblastes et leur prolifération. Les plaquettes sont une source importante de facteurs de croissance tels que le Platelet-Derived Growth Factor (PDGF), l'EGF et le TGF- $\beta$ . De plus, les hépatocytes jouent également un rôle important dans l'initiation de la fibrogenèse par la production de ROS et d'Il-33. Les HSCs sont également capables de s'activer directement par le TLR4 en réponse à des endotoxines bactériennes ou par le TLR9 en réponse à l'ADN libéré par les hépatocytes apoptotiques ou nécrotiques. La résolution de la fibrose peut être initiée par les cellules NK, à travers la sécrétion d'IFN- $\gamma$  et par cytotoxicité directe passant par les récepteurs TRAIL et FasL. Toutefois, de forts taux de TGF- $\beta$  sont capables d'inhiber les fonctions anti-fibrosantes de ces cellules (Seki and Schwabe 2015). Selon l'ampleur des dommages subis par le foie, la fibrose peut être plus ou moins importante. La fibrose peut évoluer vers une cirrhose: la cirrhose est un stade de la fibrose irréversible qui se caractérise par une inflammation chronique entraînant la destruction des cellules hépatiques et leur régénération anarchique sous forme de nodules. L'apparition de la cirrhose induit une perte des fonctions hépatiques et favorise le développement de CHC (Siegel and Zhu 2009). Toutefois, la cirrhose n'est pas une étape nécessaire pour promouvoir les CHC, jusqu'à 75% des patients qui développent un CHC sous fond de NAFLD n'ont pas développé de cirrhose (Michelotti, Machado et al. 2013)

### 3. Vers l'émergence du carcinome hépatocellulaire

Le CHC est la tumeur primitive du foie la plus fréquente et représente le 5<sup>ème</sup> cancer le plus fréquent et la 2<sup>ème</sup> cause de mortalité par cancer dans le monde (Ferlay, Soerjomataram et al. 2015). Il représente le principal sous-type histologique des tumeurs primitives du foie, soit 85 à 90% des cancers du foie (El-Serag and Rudolph 2007). Il se développe principalement sur foie cirrhotique résultant d'une maladie chronique hépatique comme l'infection par les virus de l'hépatite B et hépatite C ou l'alcoolisme chronique. Le développement de CHC a été associé aux hépatopathies stéatosiques non-alcooliques pour la première fois dans les années 1990 (Powell, Cooksley et al. 1990). Cette association est désormais considérée comme alarmante du fait de l'augmentation mondiale de la prévalence du syndrome métabolique dans la population (Baffy, Brunt et al. 2012). A titre d'exemple, une étude épidémiologique menée dans la population américaine estime qu'environ 30% de la population présente une stéatose hépatique (90 millions de personnes), 10% de ces cas développent une NASH (9 millions), 25% des NASH développent une cirrhose (2,25 millions) et 10 à 25% déclarent un CHC (200 à 500 mille) (Siegel and Zhu 2009).

Bien que la majorité des CHC se développent sur un foie cirrhotique, l'émergence de CHC sur foie stéatosique non-alcoolique non cirrhotique, suggère qu'il existe dans les NAFLD une voie particulière de carcinogénèse hépatique (Paradis, Zalinski et al. 2009, Starley, Calcagno et al. 2010). Les mécanismes de cette carcinogénèse sont encore peu décrits, mais de nombreux travaux suggèrent l'implication de la toxicité métabolique et oxydative, ainsi que l'inflammation générés au cours de la progression des NAFLD (Michelotti, Machado et al. 2013, Font-Burgada, Sun et al. 2016). La progression de la stéatose hépatique vers la NASH est favorisée par des mécanismes de lipotoxicité. Le stress oxydant et le stress du RE seraient responsables de la mort des hépatocytes, induisant une inflammation et réciproquement. Les lésions du tissu hépatique stimulent une prolifération compensatoire des hépatocytes. Cette réponse proliférative pourrait être à l'origine du développement des CHC (Maeda, Kamata et al. 2005). Le TNF- $\alpha$  et l'IL-6 impliqués dans ce mécanisme de prolifération compensatoire des hépatocytes semblent être des inducteurs de la carcinogénèse hépatique sur foie NASH (He, Dhar et al. 2013, Nakagawa, Umemura et al. 2014). D'autre part, il a été montré que l'obésité est un promoteur direct du développement de CHC, en favorisant le relargage des cytokines pro-inflammatoires. Lorsque des souris obèses sont soumises à l'agent carcinogène diéthyle-nitrosamine (DEN), le relargage de TNF- $\alpha$  et d'IL-6 provoque l'activation du facteur de transcription oncogène STAT3, favorisant ses

actions prolifératives et anti-apoptotiques qui contribuent au développement de CHC (Park, Lee et al. 2010). En condition de surcharge métabolique, la stéatose hépatique et la lipogenèse *de novo* ne sont probablement pas directement impliquées dans le développement de CHC, mais elles génèrent un microenvironnement favorable au développement tumoral (Font-Burgada, Sun et al. 2016). L'inflammation hépatique, et notamment l'activation des cellules de Kupffer, le recrutement et l'activation de macrophages périphériques contribuent à la production de TNF- $\alpha$  et d'Il-6. D'autres cellules immunitaires sont impliquées dans ce microenvironnement, on peut notamment citer les lymphocytes T CD8+ et NKT, dont la présence favorise fortement la progression de la NASH vers le CHC (Wolf, Adili et al. 2014). Par ailleurs, le microbiote intestinal intervient également dans le développement de CHC puisque sa modification, par l'augmentation du taux d'endotoxines dans la circulation portale active les cellules de Kupffer et les macrophages recrutés par l'intermédiaire du TLR4, et ainsi induire la production de cytokines pro-inflammatoires (Dapito, Mencin et al. 2012, Schwabe and Jobin 2013).

#### IV. RÔLE DU MICROENVIRONNEMENT IMMUNITAIRE DANS LE CHC

Le carcinome hépatocellulaire représente un des exemples les plus pertinents pour illustrer les cancers associés à l'inflammation. La mise en place d'une réponse inflammatoire chronique est essentielle au développement de CHC, d'autant plus que le foie possède un système immunitaire qui lui est propre, avec d'importantes propriétés immunosuppressives. De nombreux travaux dans le domaine du cancer ont permis de souligner le rôle important du microenvironnement tumoral (aussi appelé stroma tumoral) dans la cancérogénèse (de Visser and Coussens 2006, Hanahan and Weinberg 2011, Hanahan and Coussens 2012). Le concept de microenvironnement tumoral est particulièrement pertinent pour l'étude du cancer du foie puisque 80% des CHC émergent à partir d'un microenvironnement perturbé (fibrose, cirrhose).

##### 1. Système immunitaire et cancer

Le système immunitaire joue un rôle essentiel dans le contrôle des tumeurs. Il effectue une immuno-surveillance dynamique afin de préserver l'homéostasie des tissus. L'immuno-surveillance est assurée par un dialogue fonctionnel entre les cellules du microenvironnement (notamment les cellules immunitaires) et les cellules ayant initié un quelconque processus de transformation tumorale. Toutefois, de nombreux travaux montrent que la chronicité d'action de la réponse immunitaire favorise une sélection de variants tumoraux de faible immunogénicité, moins reconnus par les effecteurs du système immunitaire. Ce processus conduirait, à long terme, à un échappement tumoral caractérisé par un envahissement du tissu par la tumeur, parfois associée à une dissémination métastatique. Dans ce contexte, les acteurs du système immunitaire favoriseraient la croissance tumorale (Dunn, Old et al. 2004). Le système immunitaire a donc un rôle duel dans la carcinogénèse, étant à la fois impliqué dans la protection de l'hôte vis-à-vis de l'apparition des tumeurs, et dans le façonnage de cette tumeur : on ne parle alors plus d'immuno-surveillance mais d'**immuno-édition** des tumeurs. Cette dernière est décrite par la théorie des trois « E » de l'immuno-édition des cancers : Elimination, Equilibre et Echappement (Dunn, Old et al. 2004). L'échappement des tumeurs à l'immuno-surveillance est, aujourd'hui, considéré comme la 7<sup>ème</sup> caractéristique des cellules cancéreuses. Il s'agit de la première caractéristique extrinsèque à la cellule tumorale (Hanahan and Weinberg 2011, Hanahan and Coussens 2012).

## 2. Le carcinome hépatocellulaire

Le CHC est la tumeur primitive du foie la plus fréquente représentant la 2<sup>ème</sup> cause de mortalité par cancer dans le monde (Ferlay, Soerjomataram et al. 2015). C'est une tumeur grave pour laquelle les options thérapeutiques restent à ce jour très limitées et peu efficaces. Récemment, le recours aux chimiothérapies à base d'un inhibiteur multikinases, le Sorafenib, constitue une avancée pour le traitement du CHC, cependant les effets restent mineurs, l'allongement de la durée de vie des patients étant relativement modeste en raison de l'acquisition d'une résistance au traitement (Villanueva and Llovet, 2012). Les facteurs de risques sont bien connus : l'infection par les virus de l'hépatite B et de l'hépatite C, l'exposition à des toxines comme l'aflatoxine B1, une consommation excessive d'alcool, en moindre proportion les maladies génétiques comme l'hémochromatose (Laurent-Puig and Zucman-Rossi 2006) et plus récemment les NAFLD (Michelotti, Machado et al. 2013). Dans 90% des cas, la survenue du CHC est associée à au moins un de ces facteurs de risques.

### a) *Classification des CHC*

Des études de génomique fonctionnelle ont permis d'établir une classification des CHC en fonction des altérations génétiques en corrélation ou non avec l'étiologie. Il est aujourd'hui admis que le développement de CHC est soumis à une accumulation de modifications génétiques. Ces modifications peuvent être quantitatives (perte ou gains de chromosomes), qualitatives (mutations ponctuelles) ou épigénétiques (Laurent-Puig and Zucman-Rossi 2006, Nault and Zucman-Rossi 2014). Deux groupes distincts de CHC ont été décrits : les CHC de forte instabilité chromosomique dus à des altérations génétiques spécifiques liés aux facteurs de risques et les CHC de faible stabilité chromosomique dus à des altérations génétiques sans étiologie connue (Laurent-Puig and Zucman-Rossi 2006). Les tumeurs ayant une forte instabilité chromosomique, sont associées à des pertes de chromosomes qui résultent en l'inactivation des gènes suppresseurs de tumeur. Ces CHC se développent fréquemment chez les patients infectés par le virus de l'hépatite B. Ces tumeurs sont associées à des pertes de fonctions de l'axine 1 et de p53. Elles sont très proliférantes et présentent un aspect histologique peu différencié. La survie des patients atteints de ce type de CHC est très faible. A l'inverse, les tumeurs qui présentent une faible instabilité chromosomique se développent plus fréquemment chez les sujets non infectés par le virus de l'hépatite B. Ces tumeurs sont associées à des mutations gain de fonction dans le gène de la  $\beta$ -caténine. Elles sont peu proliférantes et d'aspect histologique bien différencié, avec une meilleure survie des patients (Laurent-Puig and Zucman-Rossi 2006, Boyault, Rickman et al. 2007).

## **b) La voie Wnt/ $\beta$ -caténine**

La voie de signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine est impliquée dans le développement de nombreuses maladies et des mutations gain de fonctions dans le gène de la  $\beta$ -caténine sont retrouvées dans 20 à 40% des CHC chez l'homme (de La Coste, Romagnolo et al. 1998, Colnot, Decaens et al. 2004). Cette voie de signalisation contrôle de nombreux processus cellulaires fondamentaux tels que la prolifération cellulaire, la polarité cellulaire ou encore le destin cellulaire au cours du développement embryonnaire et au cours de la vie adulte (Logan and Nusse 2004). Dans le foie, elle joue un rôle prépondérant dans le développement hépatique, mais également en physiologie normale dans le tissu adulte en intervenant dans la croissance et la régénération de cet organe (Thompson and Monga 2007). De manière intéressante la voie Wnt/ $\beta$ -caténine contrôle la zonation métabolique dans le foie. La  $\beta$ -caténine est exprimée constitutivement dans la première couronne d'hépatocytes de l'espace périveineux, et réprimé dans les hépatocytes périportaux, définissant ainsi un gradient porto/central de la protéine Adenomatous polyposis coli (Apc, régulateur négatif de la  $\beta$ -caténine) (Benhamouche, Decaens et al. 2006).

### ➤ Description moléculaire

Dans la cellule épithéliale, en absence de ligand Wnt, on distingue deux pools de  $\beta$ -caténine. Une partie de la  $\beta$ -caténine se retrouve à la membrane, associée au complexe d'adhésion E-cadhérine/ $\alpha$ -caténine. Ce complexe est essentiel pour l'adhérence des cellules épithéliales et constitue un lien entre le cytosquelette d'actine et les complexes jonctionnels cellulaires. La  $\beta$ -caténine cytoplasmique est quant à elle séquestrée dans un complexe multiprotéique de dégradation composé des produits des gènes suppresseurs de tumeur Apc et Axine, ainsi que les kinases casein kinase 1 (CK1) et la glycogène synthase kinase 3 (GSK3). CK1 et GSK3 phosphorylent séquentiellement la région N-terminale de la  $\beta$ -caténine, ce qui induit sa reconnaissance par le complexe E3 ubiquitine ligase  $\beta$ -Transducing repeat-containing protein ( $\beta$ -Trcp) et donc son ubiquitinylation et sa dégradation par le protéasome. En présence du ligand Wnt, ce dernier se lie à son récepteur Frizzled, ce qui entraîne la déstabilisation du complexe de dégradation de la  $\beta$ -caténine. La forme active de la  $\beta$ -caténine s'accumule alors dans le cytoplasme avant d'être transloquée dans le noyau pour former des complexes avec les facteurs de transcription Lymphoid Enhancer-binding Factor (LEF)/T-Cell Factor (TCF), et induire la transcription des gènes cibles du signal Wnt/ $\beta$ -caténine (MacDonald, Tamai et al. 2009).

### ➤ Cibles de la $\beta$ -caténine

Les gènes contrôlés par la  $\beta$ -caténine dans le foie interviennent dans de nombreux processus biologiques. Beaucoup de ces gènes sont impliqués dans le métabolisme et participent aux différentes fonctions assurées par le foie. Par exemple, la glutamine synthase et l'ornithine aminotransférase (OAT) sont impliquées dans le métabolisme de l'ammonium et sont contrôlés par la  $\beta$ -caténine. De même, la phosphoenolpyruvate carboxykinase (Pepck1), contrôlée par la voie Wnt est impliquée dans le métabolisme glucidique. Toutes les cibles de la  $\beta$ -caténine ne sont pas décrites, ni leur fonctions dans le foie. Cependant, en dehors des cibles métaboliques, une cible de la  $\beta$ -caténine ayant des propriétés immuno-modulatrices a été identifiée : Leucocyte Cell Derived Chemotaxin 2 (LECT2) (Ovejero, Cavard et al. 2004). En effet, l'inactivation totale de LECT2 chez la souris conduit à un phénotype immunitaire essentiellement hépatique, caractérisée par l'augmentation des NKT(Saito, Okumura et al. 2004). Ceci a conduit notre équipe à étudier le lien entre l'activation aberrante de la voie oncogénique  $\beta$ -caténine sur les effecteurs immunitaires du microenvironnement hépatique.

### **3. Rôle du microenvironnement immunitaire dans le CHC muté pour la voie Wnt/ $\beta$ -caténine**

A partir de modèles murins récapitulant la tumorigénèse humaine dépendante de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine, deux effecteurs interconnectés, les invariants NKT (iNKT) et LECT2, ont été identifiés comme des effecteurs cellulaires et moléculaires fondamentaux du microenvironnement tumoral. Brièvement, les iNKT sont des cellules fortement accumulées (20 à 30% des cellules immunitaires hépatiques) dans le foie de la souris et en moindre proportion chez l'homme. Elles constituent un sous-groupe de cellules T  $\alpha\beta$  caractérisées par l'expression d'un TCR semi-invariant V $\alpha$ 14-J $\alpha$ 18 chez la souris (V $\alpha$ 24-J $\alpha$ 18 chez l'homme) reconnaissant une molécule d' $\alpha$ -Galactosylcéramide présentées par des molécules de CD1d. Ces cellules possèdent également des marqueurs de cellules NK, plaçant ces effecteurs immunitaires au carrefour de l'immunité innée et adaptative. Il existe deux principaux types de NKT, les types I (iNKT) et les types II. Les iNKT sont les plus nombreuses et les plus étudiées. Elles expriment ou non le marqueur CD4 et présentent des propriétés anti-tumorales (Terabe, Swann et al. 2005). Les cellules qui présentent un phénotype de cellules activées sont capables de sécréter de grandes quantités de cytokines Th1 (IFN- $\gamma$ ) et Th2 (IL-4).

La délétion génétique de LECT2 et/ou des iNKT se traduit par l'émergence de formes malignes de CHC très invasives qui s'accompagnent de métastases pulmonaires. L'activation oncogénique de la  $\beta$ -caténine est donc capable d'induire simultanément dans le foie, un programme à la fois pro- et anti-inflammatoire, spécifiant l'intensité de la réponse inflammatoire et détermine le degré d'agressivité des tumeurs (Anson, Crain-Denoyelle et al. 2012). Les rôles respectifs de LECT2 et des iNKT dans le contrôle du développement tumoral du foie, ainsi que les interactions des iNKT avec d'autres effecteurs du microenvironnement tumoral restent encore mal compris. De manière intéressante, dans ces modèles de CHC très agressifs, nous avons identifié une importante accumulation de cellules myéloïdes. Ces dernières seraient responsables de l'agressivité tumorale et de la formation de métastases pulmonaires observées (L'Hermitte et al., manuscrit en préparation).

#### **4. Leukocyte Cell-Derived Chemotaxin 2**

LECT2 est une petite protéine de 16,4 kDa initialement mise en évidence chez l'homme (Yamagoe, Yamakawa et al. 1996). D'autres études ont permis de retrouver LECT2 dans différentes espèces de mammifères comme la souris, la plupart des vertébrés et les poissons (Yamagoe, Mizuno et al. 1998, Yamagoe, Watanabe et al. 1998, Fujiki, Shin et al. 2000, Kokkinos, Kazantzi et al. 2005). Le gène codant pour LECT2 est très conservé au sein des espèces. Le LECT2 murin et humain est constitué de 151 acides aminés, contenant un peptide signal. La protéine mature contient 133 acides aminés dont 6 résidus cystéine complètement conservés chez tous les mammifères. La principale source de LECT2 est le foie, où il est produit, sous le contrôle de la  $\beta$ -caténine, par les hépatocytes de la zone périverneuse (Ovejero, Cavard et al. 2004).

LECT2 a d'abord été décrit comme un facteur chimiotactique pour les neutrophiles (Yamagoe, Mizuno et al. 1998). De plus, cette protéine avait parallèlement été identifiée comme la chondromoduline II, retrouvée dans le cartilage des bovins et stimulant la croissance des chondrocytes (Nagai, Hamada et al. 1998). Depuis ces travaux, LECT2 a été impliqué dans d'autres processus comme la croissance cellulaire, la différenciation, la réparation et les réponses autoimmunes. Ces données suggèrent que LECT2 posséderait un éventail de fonctions. Cependant, les mécanismes qui conduisent aux différentes fonctions exercées par LECT2, au niveau cellulaire et moléculaire, ne sont pas connus. Une étude a montré des interactions de LECT2 avec la transferrine et un récepteur lectine de type C chez le poisson et la souris (Chen, Yang et al. 2009, Chen, Lu et al. 2010). Plus récemment, un

récepteur lectine de type C chez la souris a été mis en évidence dans un modèle de choc septique induit par le LPS, il s'agit de la molécule CD209a, orthologue humain de DC-SIGN(Lu, Chen et al. 2013).

De manière intéressante, LECT2 est retrouvé dans certaines pathologies. Par exemple, il est impliqué dans la formation de fibrilles amyloïdes à l'origine de l'amyloïdose rénale (Benson, James et al. 2008). Par ailleurs, une étude japonaise a démontré qu'un polymorphisme dans le gène de LECT2 est associé à des arthrites rhumatoïdes sévères (Kameoka, Yamagoe et al. 2000). En accord avec ces résultats, il a été rapporté une accumulation de LECT2 dans les articulations dans des modèles murins d'arthrite induite par des anticorps anti-collagène. Il est intéressant de souligner que chez les souris déficientes en LECT2, le développement de l'arthrite rhumatoïde est plus sévère (Okumura, Saito et al. 2008), ce qui semble suggérer des propriétés anti-inflammatoires de LECT2 dans cette pathologie. De plus, des études chez le poisson zèbre ont permis de montrer une production massive de LECT2 suite à une infection bactérienne (Lin, Chen et al. 2007). Plus récemment, des études menées chez le poisson *ayu* suggèrent l'implication de LECT2 dans la réponse inflammatoire médiée par les monocytes/macrophages suite à une infection bactérienne (Chen, Chen et al. 2014, Ma, Shi et al. 2016). Ces études suggèrent un rôle actif de LECT2 dans le système immunitaire lors d'infections bactériennes. Toutefois, la démonstration du contrôle de l'homéostasie des NKT par LECT2 est la preuve la plus évidente de ses fonctions immuno-régulatrices. En effet, les souris LECT2<sup>-/-</sup> arborent un phénotype immunitaire restreint au tissu hépatique. Ces souris possèdent une proportion et un nombre de NKT deux fois plus important que chez les souris sauvages, alors que les autres populations leucocytaires hépatiques ne semblent pas modifiées, la souris vit normalement, sans présenter d'autres phénotypes. Cependant, lorsqu'une hépatite est induite par injection de concanavaleine-A, ces animaux présentent une sensibilité augmentée à la mort cellulaire hépatique, avec l'apparition d'importants dommages du tissu hépatique. Ce phénotype est associé à une augmentation de la production d'IL-4, ainsi que l'expression de Fas-L(Saito, Okumura et al. 2004). De plus, dans un contexte de tumorigénèse, notre équipe a démontré l'importance de LECT2 dans le contrôle de la réponse inflammatoire générée au cours des CHC mutés pour la voie Wnt/ $\beta$ -caténine (Anson, Crain-Denoyelle et al. 2012). Par ailleurs, il semblerait que LECT2 soit également impliqué dans l'invasion vasculaire et la dissémination métastatique dans le CHC. En effet, LECT2 a la capacité de se fixer, de manière non compétitive, au récepteur cMET sans empêcher la fixation de son ligand HGF. La fixation de LECT2 entraîne

une inhibition de la signalisation HGF/cMET, décrite pour favoriser le développement de tumeurs agressives, par le recrutement de la phosphotyrosine phosphatase (PTP) -1B (Chen, Yang et al. 2014).

Plus récemment, LECT2 a été identifié comme un acteur important dans le syndrome métabolique. Une étude menée sur une cohorte de patients japonais a permis de montrer pour la première fois une augmentation du taux de LECT2 sérique chez des patients obèses et chez des patients qui présentent une stéatose hépatique (Okumura, Suzuki et al. 2013). De plus, LECT2 a été identifiée comme nouvelle hépatokine impliquée dans la résistance à l'insuline du muscle lisse, dans un contexte d'obésité. Cette étude a montré que la délétion génétique de LECT2 chez la souris dans un contexte d'obésité, se manifestait par une augmentation de la sensibilité à l'insuline du tissu musculaire. Pour confirmer ces données, un traitement de cellules musculaires C2C12 en culture par du LECT2 recombinant a montré un défaut de la voie de signalisation insulinique par l'activation de JNK (Lan, Misu et al. 2014). De plus, une étude menée sur les lignées cellulaires THP-1 et HUVECs a montré que LECT2 était capable d'activer la voie de signalisation JNK, par l'intermédiaire de sa fixation à son récepteur CD209a. L'activation de cette voie de signalisation induit la production d'ICAM-1 et des cytokines pro-inflammatoires telle que le TNF- $\alpha$ , l'IL-1 $\beta$  et MCP-1 (Hwang, Jung et al. 2015). Ces études suggèrent très fortement l'implication de LECT2 dans la physiopathologie hépatique et plus particulièrement dans la progression de la NAFLD/NASH.

## OBJECTIFS DE L'ETUDE

---

A partir de nos résultats et des données de la littérature, nos objectifs généraux sont de comprendre le rôle fonctionnel de LECT2 dans le tissu hépatique. Nos objectifs spécifiques sont de comprendre d'une part, le rôle de LECT2 dans le cycle de division cellulaire et le contrôle de la ploïdie de l'hépatocyte et d'autre part, son implication dans le métabolisme lipidique.

Pour répondre à ces questions, nous avons combiné des approches *in vivo* et *ex-vivo*, à la fois en physiologie et dans un contexte physiopathologique de stress oxydant associé à l'inflammation, à partir de modèles murins déficients en LECT2. Par ailleurs, en collaboration avec le Dr. Philippe Gual (C3M, INSERM U1065, Nice), nous avons eu un accès à des cohortes de patients présentant un NAFLD.

## BIBLIOGRAPHIE

- Abu-Tair, L., J. H. Axelrod, S. Doron, Y. Ovadya, V. Krizhanovsky, E. Galun, J. Amer and R. Safadi (2013). "Natural killer cell-dependent anti-fibrotic pathway in liver injury via Toll-like receptor-9." PLoS One**8**(12): e82571.
- Angulo, P. (2002). "Nonalcoholic fatty liver disease." N Engl J Med**346**(16): 1221-1231.
- Anson, M., A. M. Crain-Denoyelle, V. Baud, F. Chereau, A. Gougelet, B. Terris, S. Yamagoe, S. Colnot, M. Viguier, C. Perret and J. P. Couty (2012). "Oncogenic beta-catenin triggers an inflammatory response that determines the aggressiveness of hepatocellular carcinoma in mice." J Clin Invest**122**(2): 586-599.
- Anstee, Q. M. and C. P. Day (2013). "The genetics of NAFLD." Nat Rev Gastroenterol Hepatol**10**(11): 645-655.
- Anstee, Q. M. and R. D. Goldin (2006). "Mouse models in non-alcoholic fatty liver disease and steatohepatitis research." Int J Exp Pathol**87**(1): 1-16.
- Arguello, G., E. Balboa, M. Arrese and S. Zanlungo (2015). "Recent insights on the role of cholesterol in non-alcoholic fatty liver disease." Biochim Biophys Acta**1852**(9): 1765-1778.
- Baeck, C., A. Wehr, K. R. Karlmark, F. Heymann, M. Vucur, N. Gassler, S. Huss, S. Klussmann, D. Eulberg, T. Luedde, C. Trautwein and F. Tacke (2012). "Pharmacological inhibition of the chemokine CCL2 (MCP-1) diminishes liver macrophage infiltration and steatohepatitis in chronic hepatic injury." Gut**61**(3): 416-426.
- Baffy, G., E. M. Brunt and S. H. Caldwell (2012). "Hepatocellular carcinoma in non-alcoholic fatty liver disease: an emerging menace." J Hepatol**56**(6): 1384-1391.
- Begriche, K., A. Igoudjil, D. Pessayre and B. Fromenty (2006). "Mitochondrial dysfunction in NASH: causes, consequences and possible means to prevent it." Mitochondrion**6**(1): 1-28.
- Begriche, K., J. Massart, M. A. Robin, F. Bonnet and B. Fromenty (2013). "Mitochondrial adaptations and dysfunctions in nonalcoholic fatty liver disease." Hepatology**58**(4): 1497-1507.
- Benedetti, A., C. Bassotti, K. Rapino, L. Marucci and A. M. Jezequel (1996). "A morphometric study of the epithelium lining the rat intrahepatic biliary tree." J Hepatol**24**(3): 335-342.
- Benhamouche, S., T. Decaens, C. Godard, R. Chambrey, D. S. Rickman, C. Moinard, M. Vasseur-Cognet, C. J. Kuo, A. Kahn, C. Perret and S. Colnot (2006). "Apc tumor suppressor gene is the "zonation-keeper" of mouse liver." Dev Cell**10**(6): 759-770.
- Benson, M. D., S. James, K. Scott, J. J. Liepnieks and B. Kluve-Beckerman (2008). "Leukocyte chemotactic factor 2: A novel renal amyloid protein." Kidney Int**74**(2): 218-222.
- Berriot-Varoqueaux, N., L. P. Aggerbeck, M. Samson-Bouma and J. R. Wetterau (2000). "The role of the microsomal triglyceride transfer protein in abetalipoproteinemia." Annu Rev Nutr**20**: 663-697.
- Bhargava, P. and C. H. Lee (2012). "Role and function of macrophages in the metabolic syndrome." Biochem J**442**(2): 253-262.
- Bieghs, V. and C. Trautwein (2013). "The innate immune response during liver inflammation and metabolic disease." Trends Immunol**34**(9): 446-452.
- Blouin, A., R. P. Bolender and E. R. Weibel (1977). "Distribution of organelles and membranes between hepatocytes and nonhepatocytes in the rat liver parenchyma. A stereological study." J Cell Biol**72**(2): 441-455.
- Borowiak, M., A. N. Garratt, T. Wustefeld, M. Strehle, C. Trautwein and C. Birchmeier (2004). "Met provides essential signals for liver regeneration." Proc Natl Acad Sci U S A**101**(29): 10608-10613.
- Bovenga, F., C. Sabba and A. Moschetta (2015). "Uncoupling nuclear receptor LXR and cholesterol metabolism in cancer." Cell Metab**21**(4): 517-526.

- Boyault, S., D. S. Rickman, A. de Reynies, C. Balabaud, S. Rebouissou, E. Jeannot, A. Herault, J. Saric, J. Belghiti, D. Franco, P. Bioulac-Sage, P. Laurent-Puig and J. Zucman-Rossi (2007). "Transcriptome classification of HCC is related to gene alterations and to new therapeutic targets." *Hepatology***45**(1): 42-52.
- Bradbury, M. W. (2006). "Lipid metabolism and liver inflammation. I. Hepatic fatty acid uptake: possible role in steatosis." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol***290**(2): G194-198.
- Bugianesi, E., A. J. McCullough and G. Marchesini (2005). "Insulin resistance: a metabolic pathway to chronic liver disease." *Hepatology***42**(5): 987-1000.
- Burt, A. D., A. Mutton and C. P. Day (1998). "Diagnosis and interpretation of steatosis and steatohepatitis." *Semin Diagn Pathol***15**(4): 246-258.
- Buzzetti, E., M. Pinzani and E. A. Tsochatzis (2016). "The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD)." *Metabolism*.
- Caballero, F., A. Fernandez, A. M. De Lacy, J. C. Fernandez-Checa, J. Caballeria and C. Garcia-Ruiz (2009). "Enhanced free cholesterol, SREBP-2 and StAR expression in human NASH." *J Hepatol***50**(4): 789-796.
- Cai, D., M. Yuan, D. F. Frantz, P. A. Melendez, L. Hansen, J. Lee and S. E. Shoelson (2005). "Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK-beta and NF-kappaB." *Nat Med***11**(2): 183-190.
- Celton-Morizur, S. and C. Desdouets (2009). "[Cellular polyploidy in hepatic tissue: new role of insulin]." *Med Sci (Paris)***25**(6-7): 651-653.
- Celton-Morizur, S., G. Merlen, D. Couton, G. Margall-Ducos and C. Desdouets (2009). "The insulin/Akt pathway controls a specific cell division program that leads to generation of binucleated tetraploid liver cells in rodents." *J Clin Invest***119**(7): 1880-1887.
- Chatzigeorgiou, A., K. J. Chung, R. Garcia-Martin, V. I. Alexaki, A. Klotzsche-von Ameln, J. Phieler, D. Sprott, W. Kanczkowski, T. Tzanavari, M. Bdeir, S. Bergmann, M. Cartellieri, M. Bachmann, P. Nikolakopoulou, A. Androutsellis-Theotokis, G. Siegert, S. R. Bornstein, M. H. Muders, L. Boon, K. P. Karalis, E. Lutgens and T. Chavakis (2014). "Dual role of B7 costimulation in obesity-related nonalcoholic steatohepatitis and metabolic dysregulation." *Hepatology***60**(4): 1196-1210.
- Chaurasia, B. and S. A. Summers (2015). "Ceramides - Lipotoxic Inducers of Metabolic Disorders." *Trends Endocrinol Metab***26**(10): 538-550.
- Chen, C. K., C. Y. Yang, K. T. Hua, M. C. Ho, G. Johansson, Y. M. Jeng, C. N. Chen, M. W. Chen, W. J. Lee, J. L. Su, T. C. Lai, C. C. Chou, B. C. Ho, C. F. Chang, P. H. Lee, K. J. Chang, M. Hsiao, M. T. Lin and M. L. Kuo (2014). "Leukocyte cell-derived chemotaxin 2 antagonizes MET receptor activation to suppress hepatocellular carcinoma vascular invasion by protein tyrosine phosphatase 1B recruitment." *Hepatology***59**(3): 974-985.
- Chen, J., Q. Chen, X. J. Lu and C. H. Li (2014). "LECT2 improves the outcomes in ayu with *Vibrio anguillarum* infection via monocytes/macrophages." *Fish Shellfish Immunol***41**(2): 586-592.
- Chen, J., X. J. Lu, H. Y. Yang and Y. H. Shi (2010). "An interaction between a C-type lectin receptor and leukocyte cell-derived chemotaxin 2 of ayu, *Plecoglossus altivelis*." *Fish Shellfish Immunol***28**(1): 245-248.
- Chen, J., H. Y. Yang, Y. H. Shi and M. Y. Li (2009). "An interaction between leukocyte cell-derived chemotaxin 2 and transferrin of ayu, *Plecoglossus altivelis*." *Fish Shellfish Immunol***26**(3): 536-542.
- Clawson, G. A. (1989). "Mechanisms of carbon tetrachloride hepatotoxicity." *Pathol Immunopathol Res***8**(2): 104-112.
- Collin de Lhortet, A., H. Gilgenkrantz and J. E. Guidotti (2012). "EGFR: A Master Piece in G1/S Phase Transition of Liver Regeneration." *Int J Hepatol***2012**: 476910.

- Colnot, S., T. Decaens, M. Niwa-Kawakita, C. Godard, G. Hamard, A. Kahn, M. Giovannini and C. Perret (2004). "Liver-targeted disruption of Apc in mice activates beta-catenin signaling and leads to hepatocellular carcinomas." Proc Natl Acad Sci U S A**101**(49): 17216-17221.
- Crispe, I. N. (2009). "The liver as a lymphoid organ." Annu Rev Immunol**27**: 147-163.
- Crispe, I. N., M. Giannandrea, I. Klein, B. John, B. Sampson and S. Wuensch (2006). "Cellular and molecular mechanisms of liver tolerance." Immunol Rev**213**: 101-118.
- Cusi, K. (2009). "Role of insulin resistance and lipotoxicity in non-alcoholic steatohepatitis." Clin Liver Dis**13**(4): 545-563.
- Dapito, D. H., A. Mencin, G. Y. Gwak, J. P. Pradere, M. K. Jang, I. Mederacke, J. M. Caviglia, H. Khiabani, A. Adeyemi, R. Bataller, J. H. Lefkowitz, M. Bower, R. Friedman, R. B. Sartor, R. Rabadan and R. F. Schwabe (2012). "Promotion of hepatocellular carcinoma by the intestinal microbiota and TLR4." Cancer Cell**21**(4): 504-516.
- Davoli, T. and T. de Lange (2011). "The causes and consequences of polyploidy in normal development and cancer." Annu Rev Cell Dev Biol**27**: 585-610.
- Day, C. P. and O. F. James (1998). "Steatohepatitis: a tale of two "hits"?" Gastroenterology**114**(4): 842-845.
- de La Coste, A., B. Romagnolo, P. Billuart, C. A. Renard, M. A. Buendia, O. Soubrane, M. Fabre, J. Chelly, C. Beldjord, A. Kahn and C. Perret (1998). "Somatic mutations of the beta-catenin gene are frequent in mouse and human hepatocellular carcinomas." Proc Natl Acad Sci U S A**95**(15): 8847-8851.
- de Visser, K. E. and L. M. Coussens (2006). "The inflammatory tumor microenvironment and its impact on cancer development." Contrib Microbiol**13**: 118-137.
- Dentin, R., J. P. Pegorier, F. Benhamed, F. Foufelle, P. Ferre, V. Fauveau, M. A. Magnuson, J. Girard and C. Postic (2004). "Hepatic glucokinase is required for the synergistic action of ChREBP and SREBP-1c on glycolytic and lipogenic gene expression." J Biol Chem**279**(19): 20314-20326.
- Donnelly, K. L., C. I. Smith, S. J. Schwarzenberg, J. Jessurun, M. D. Boldt and E. J. Parks (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.
- du Plessis, J., J. van Pelt, H. Korf, C. Mathieu, B. van der Schueren, M. Lannoo, T. Oyen, B. Topal, G. Fetter, S. Nayler, T. van der Merwe, P. Windmolders, L. Van Gaal, A. Verrijken, G. Hubens, M. Gericke, D. Cassiman, S. Francque, F. Nevens and S. van der Merwe (2015). "Association of Adipose Tissue Inflammation With Histologic Severity of Nonalcoholic Fatty Liver Disease." Gastroenterology**149**(3): 635-648 e614.
- Dunn, G. P., L. J. Old and R. D. Schreiber (2004). "The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting." Immunity**21**(2): 137-148.
- Dunn, G. P., L. J. Old and R. D. Schreiber (2004). "The three Es of cancer immunoediting." Annu Rev Immunol**22**: 329-360.
- Dushay, J., P. C. Chui, G. S. Gopalakrishnan, M. Varela-Rey, M. Crawley, F. M. Fisher, M. K. Badman, M. L. Martinez-Chantar and E. Maratos-Flier (2010). "Increased fibroblast growth factor 21 in obesity and nonalcoholic fatty liver disease." Gastroenterology**139**(2): 456-463.
- Eaton, S., A. M. Zaitoun, C. O. Record and K. Bartlett (1996). "beta-Oxidation in human alcoholic and non-alcoholic hepatic steatosis." Clin Sci (Lond)**90**(4): 307-313.
- El-Serag, H. B. and K. L. Rudolph (2007). "Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis." Gastroenterology**132**(7): 2557-2576.
- Fausto, N., J. S. Campbell and K. J. Riehle (2006). "Liver regeneration." Hepatology**43**(2 Suppl 1): S45-53.

- Ferlay, J., I. Soerjomataram, R. Dikshit, S. Eser, C. Mathers, M. Rebelo, D. M. Parkin, D. Forman and F. Bray (2015). "Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012." *Int J Cancer***136**(5): E359-386.
- Fernandez, C., V. Lobo Md Mdel, D. Gomez-Coronado and M. A. Lasuncion (2004). "Cholesterol is essential for mitosis progression and its deficiency induces polyploid cell formation." *Exp Cell Res***300**(1): 109-120.
- Ferre, P. and F. Foufelle (2010). "Hepatic steatosis: a role for de novo lipogenesis and the transcription factor SREBP-1c." *Diabetes Obes Metab***12 Suppl 2**: 83-92.
- Flowers, M. T., A. K. Groen, A. T. Oler, M. P. Keller, Y. Choi, K. L. Schueler, O. C. Richards, H. Lan, M. Miyazaki, F. Kuipers, C. M. Kendzioriski, J. M. Ntambi and A. D. Attie (2006). "Cholestasis and hypercholesterolemia in SCD1-deficient mice fed a low-fat, high-carbohydrate diet." *J Lipid Res***47**(12): 2668-2680.
- Font-Burgada, J., B. Sun and M. Karin (2016). "Obesity and Cancer: The Oil that Feeds the Flame." *Cell Metab***23**(1): 48-62.
- Foretz, M., C. Guichard, P. Ferre and F. Foufelle (1999). "Sterol regulatory element binding protein-1c is a major mediator of insulin action on the hepatic expression of glucokinase and lipogenesis-related genes." *Proc Natl Acad Sci U S A***96**(22): 12737-12742.
- Friedman, S. L. (2008). "Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver." *Physiol Rev***88**(1): 125-172.
- Fu, S., L. Yang, P. Li, O. Hofmann, L. Dicker, W. Hide, X. Lin, S. M. Watkins, A. R. Ivanov and G. S. Hotamisligil (2011). "Aberrant lipid metabolism disrupts calcium homeostasis causing liver endoplasmic reticulum stress in obesity." *Nature***473**(7348): 528-531.
- Fujii, H., Y. Ikura, J. Arimoto, K. Sugioka, J. C. Iezzoni, S. H. Park, T. Naruko, H. Itabe, N. Kawada, S. H. Caldwell and M. Ueda (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.
- Fujiki, K., D. H. Shin, M. Nakao and T. Yano (2000). "Molecular cloning of carp (*Cyprinus carpio*) leucocyte cell-derived chemotaxin 2, glia maturation factor beta, CD45 and lysozyme C by use of suppression subtractive hybridisation." *Fish Shellfish Immunol***10**(7): 643-650.
- Fujita, K., Y. Nozaki, K. Wada, M. Yoneda, Y. Fujimoto, M. Fujitake, H. Endo, H. Takahashi, M. Inamori, N. Kobayashi, H. Kirikoshi, K. Kubota, S. Saito and A. Nakajima (2009). "Dysfunctional very-low-density lipoprotein synthesis and release is a key factor in nonalcoholic steatohepatitis pathogenesis." *Hepatology***50**(3): 772-780.
- Gao, B., S. Radaeva and O. Park (2009). "Liver natural killer and natural killer T cells: immunobiology and emerging roles in liver diseases." *J Leukoc Biol***86**(3): 513-528.
- Gentric, G., V. Maillet, V. Paradis, D. Couton, A. L'Hermitte, G. Panasyuk, B. Fromenty, S. Celton-Morizur and C. Desdouets (2015). "Oxidative stress promotes pathologic polyploidization in nonalcoholic fatty liver disease." *J Clin Invest***125**(3): 981-992.
- Germain, L., M. J. Blouin and N. Marceau (1988). "Biliary epithelial and hepatocytic cell lineage relationships in embryonic rat liver as determined by the differential expression of cytokeratins, alpha-fetoprotein, albumin, and cell surface-exposed components." *Cancer Res***48**(17): 4909-4918.
- Gimeno, R. E. and D. E. Moller (2014). "FGF21-based pharmacotherapy--potential utility for metabolic disorders." *Trends Endocrinol Metab***25**(6): 303-311.
- Girard, J. (1995). "[Role of free fatty acids in the insulin resistance of non-insulin-dependent diabetes]." *Diabetes Metab***21**(2): 79-88.
- Greenberg, A. S. and R. A. Coleman (2011). "Expanding roles for lipid droplets." *Trends Endocrinol Metab***22**(6): 195-196.

- Gregor, M. F. and G. S. Hotamisligil (2007). "Thematic review series: Adipocyte Biology. Adipocyte stress: the endoplasmic reticulum and metabolic disease." *J Lipid Res***48**(9): 1905-1914.
- Grompe, M. (2014). "Liver stem cells, where art thou?" *Cell Stem Cell***15**(3): 257-258.
- Guidotti, J. E., O. Bregerie, A. Robert, P. Debey, C. Brechet and C. Desdouets (2003). "Liver cell polyploidization: a pivotal role for binuclear hepatocytes." *J Biol Chem***278**(21): 19095-19101.
- Gupta, S. (2000). "Hepatic polyploidy and liver growth control." *Semin Cancer Biol***10**(3): 161-171.
- Haas, J. T., S. Francque and B. Staels (2015). "Pathophysiology and Mechanisms of Nonalcoholic Fatty Liver Disease." *Annu Rev Physiol*.
- Hanahan, D. and L. M. Coussens (2012). "Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment." *Cancer Cell***21**(3): 309-322.
- Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2011). "Hallmarks of cancer: the next generation." *Cell***144**(5): 646-674.
- Haussinger, D., W. H. Lamers and A. F. Moorman (1992). "Hepatocyte heterogeneity in the metabolism of amino acids and ammonia." *Enzyme***46**(1-3): 72-93.
- He, G., D. Dhar, H. Nakagawa, J. Font-Burgada, H. Ogata, Y. Jiang, S. Shalapour, E. Seki, S. E. Yost, K. Jepsen, K. A. Frazer, O. Harismendy, M. Hatziaepostolou, D. Iliopoulos, A. Suetsugu, R. M. Hoffman, R. Tateishi, K. Koike and M. Karin (2013). "Identification of liver cancer progenitors whose malignant progression depends on autocrine IL-6 signaling." *Cell***155**(2): 384-396.
- Henao-Mejia, J., E. Elinav, C. Jin, L. Hao, W. Z. Mehal, T. Strowig, C. A. Thaiss, A. L. Kau, S. C. Eisenbarth, M. J. Jurczak, J. P. Camporez, G. I. Shulman, J. I. Gordon, H. M. Hoffman and R. A. Flavell (2012). "Inflammasome-mediated dysbiosis regulates progression of NAFLD and obesity." *Nature***482**(7384): 179-185.
- Hendriks, T., S. M. Walenbergh, M. H. Hofker and R. Shiri-Sverdlov (2014). "Lysosomal cholesterol accumulation: driver on the road to inflammation during atherosclerosis and non-alcoholic steatohepatitis." *Obes Rev***15**(5): 424-433.
- Henning, J. R., C. S. Graffeo, A. Rehman, N. C. Fallon, C. P. Zambirinis, A. Ochi, R. Barilla, M. Jamal, M. Deutsch, S. Greco, M. Ego-Osuala, U. Bin-Saeed, R. S. Rao, S. Badar, J. P. Quesada, D. Acehan and G. Miller (2013). "Dendritic cells limit fibroinflammatory injury in nonalcoholic steatohepatitis in mice." *Hepatology***58**(2): 589-602.
- Heymann, F., J. Peusquens, I. Ludwig-Portugall, M. Kohlhepp, C. Ergen, P. Niemietz, C. Martin, N. van Rooijen, J. C. Ochando, G. J. Randolph, T. Luedde, F. Ginhoux, C. Kurts, C. Trautwein and F. Tacke (2015). "Liver inflammation abrogates immunological tolerance induced by Kupffer cells." *Hepatology***62**(1): 279-291.
- Heymann, F. and F. Tacke (2016). "Immunology in the liver - from homeostasis to disease." *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*.
- Hotamisligil, G. S. (2010). "Endoplasmic reticulum stress and the inflammatory basis of metabolic disease." *Cell***140**(6): 900-917.
- Hsieh, K., Y. K. Lee, C. Londos, B. M. Raaka, K. T. Dalen and A. R. Kimmel (2012). "Perilipin family members preferentially sequester to either triacylglycerol-specific or cholesteryl-ester-specific intracellular lipid storage droplets." *J Cell Sci***125**(Pt 17): 4067-4076.
- Hussain, M. M., J. Shi and P. Dreizen (2003). "Microsomal triglyceride transfer protein and its role in apoB-lipoprotein assembly." *J Lipid Res***44**(1): 22-32.
- Hwang, H. J., T. W. Jung, H. C. Hong, J. A. Seo, S. G. Kim, N. H. Kim, K. M. Choi, D. S. Choi, S. H. Baik and H. J. Yoo (2015). "LECT2 induces atherosclerotic inflammatory reaction via CD209 receptor-mediated JNK phosphorylation in human endothelial cells." *Metabolism***64**(9): 1175-1182.

- Ikura, Y. and S. H. Caldwell (2015). "Lipid droplet-associated proteins in alcoholic liver disease: a potential linkage with hepatocellular damage." Int J Clin Exp Pathol**8**(8): 8699-8708.
- Incassati, A., D. Patel and D. J. McCance (2006). "Induction of tetraploidy through loss of p53 and upregulation of Plk1 by human papillomavirus type-16 E6." Oncogene**25**(17): 2444-2451.
- Ioannou, G. N. (2016). "The Role of Cholesterol in the Pathogenesis of NASH." Trends Endocrinol Metab**27**(2): 84-95.
- Ioannou, G. N., W. G. Haigh, D. Thorning and C. Savard (2013). "Hepatic cholesterol crystals and crown-like structures distinguish NASH from simple steatosis." J Lipid Res**54**(5): 1326-1334.
- Ioannou, G. N., D. M. Van Rooyen, C. Savard, W. G. Haigh, M. M. Yeh, N. C. Teoh and G. C. Farrell (2015). "Cholesterol-lowering drugs cause dissolution of cholesterol crystals and disperse Kupffer cell crown-like structures during resolution of NASH." J Lipid Res**56**(2): 277-285.
- Jenne, C. N. and P. Kubes (2013). "Immune surveillance by the liver." Nat Immunol**14**(10): 996-1006.
- Jungermann, K. and N. Katz (1989). "Functional specialization of different hepatocyte populations." Physiol Rev**69**(3): 708-764.
- Jungermann, K. and T. Kietzmann (1996). "Zonation of parenchymal and nonparenchymal metabolism in liver." Annu Rev Nutr**16**: 179-203.
- Jungermann, K. and R. G. Thurman (1992). "Hepatocyte heterogeneity in the metabolism of carbohydrates." Enzyme**46**(1-3): 33-58.
- Kaestner, K. H. (2009). "In the zone: how a hepatocyte knows where it is." Gastroenterology**137**(2): 425-427.
- Kakuma, T., Y. Lee, M. Higa, Z. Wang, W. Pan, I. Shimomura and R. H. Unger (2000). "Leptin, troglitazone, and the expression of sterol regulatory element binding proteins in liver and pancreatic islets." Proc Natl Acad Sci U S A**97**(15): 8536-8541.
- Kameoka, Y., S. Yamagoe, Y. Hatano, T. Kasama and K. Suzuki (2000). "Val58Ile polymorphism of the neutrophil chemoattractant LECT2 and rheumatoid arthritis in the Japanese population." Arthritis Rheum**43**(6): 1419-1420.
- Karin, M. and H. Clevers (2016). "Reparative inflammation takes charge of tissue regeneration." Nature**529**(7586): 307-315.
- Kawano, Y. and D. E. Cohen (2013). "Mechanisms of hepatic triglyceride accumulation in non-alcoholic fatty liver disease." J Gastroenterol**48**(4): 434-441.
- Kokkinos, P. A., A. Kazantzi, G. Sfyroera and I. K. Zarkadis (2005). "Molecular cloning of leukocyte cell-derived chemotaxin 2 in rainbow trout." Fish Shellfish Immunol**18**(5): 371-380.
- Koliaki, C., J. Szendroedi, K. Kaul, T. Jelenik, P. Nowotny, F. Jankowiak, C. Herder, M. Carstensen, M. Krausch, W. T. Knoefel, M. Schlensak and M. Roden (2015). "Adaptation of hepatic mitochondrial function in humans with non-alcoholic fatty liver is lost in steatohepatitis." Cell Metab**21**(5): 739-746.
- Koop, D. R. (1992). "Oxidative and reductive metabolism by cytochrome P450 2E1." FASEB J**6**(2): 724-730.
- Kumashiro, N., D. M. Erion, D. Zhang, M. Kahn, S. A. Beddow, X. Chu, C. D. Still, G. S. Gerhard, X. Han, J. Dziura, K. F. Petersen, V. T. Samuel and G. I. Shulman (2011). "Cellular mechanism of insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease." Proc Natl Acad Sci U S A**108**(39): 16381-16385.
- Lan, F., H. Misu, K. Chikamoto, H. Takayama, A. Kikuchi, K. Mohri, N. Takata, H. Hayashi, N. Matsuzawa-Nagata, Y. Takeshita, H. Noda, Y. Matsumoto, T. Ota, T. Nagano, M. Nakagen, K. Miyamoto, K. Takatsuki, T. Seo, K. Iwayama, K. Tokuyama, S. Matsugo,

- H. Tang, Y. Saito, S. Yamagoe, S. Kaneko and T. Takamura (2014). "LECT2 functions as a hepatokine that links obesity to skeletal muscle insulin resistance." *Diabetes***63**(5): 1649-1664.
- Larter, C. Z., M. M. Yeh, J. Williams, K. S. Bell-Anderson and G. C. Farrell (2008). "MCD-induced steatohepatitis is associated with hepatic adiponectin resistance and adipogenic transformation of hepatocytes." *J Hepatol***49**(3): 407-416.
- Laurent-Puig, P. and J. Zucman-Rossi (2006). "Genetics of hepatocellular tumors." *Oncogene***25**(27): 3778-3786.
- Leclercq, I. A., G. C. Farrell, J. Field, D. R. Bell, F. J. Gonzalez and G. R. Robertson (2000). "CYP2E1 and CYP4A as microsomal catalysts of lipid peroxides in murine nonalcoholic steatohepatitis." *J Clin Invest***105**(8): 1067-1075.
- Lee, A. H., E. F. Scapa, D. E. Cohen and L. H. Glimcher (2008). "Regulation of hepatic lipogenesis by the transcription factor XBP1." *Science***320**(5882): 1492-1496.
- Lewis, G. F., A. Carpentier, K. Adeli and A. Giacca (2002). "Disordered fat storage and mobilization in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes." *Endocr Rev***23**(2): 201-229.
- Lin, B., S. Chen, Z. Cao, Y. Lin, D. Mo, H. Zhang, J. Gu, M. Dong, Z. Liu and A. Xu (2007). "Acute phase response in zebrafish upon *Aeromonas salmonicida* and *Staphylococcus aureus* infection: striking similarities and obvious differences with mammals." *Mol Immunol***44**(4): 295-301.
- Liu, W., S. S. Baker, R. D. Baker, N. J. Nowak and L. Zhu (2011). "Upregulation of hemoglobin expression by oxidative stress in hepatocytes and its implication in nonalcoholic steatohepatitis." *PLoS One***6**(9): e24363.
- Lo Sasso, G., N. Celli, M. Caboni, S. Murzilli, L. Salvatore, A. Morgano, M. Vacca, T. Pagliani, P. Parini and A. Moschetta (2010). "Down-regulation of the LXR transcriptome provides the requisite cholesterol levels to proliferating hepatocytes." *Hepatology***51**(4): 1334-1344.
- Logan, C. Y. and R. Nusse (2004). "The Wnt signaling pathway in development and disease." *Annu Rev Cell Dev Biol***20**: 781-810.
- Loyer, P., S. Cariou, D. Glaise, M. Bilodeau, G. Baffet and C. Guguen-Guillouzo (1996). "Growth factor dependence of progression through G1 and S phases of adult rat hepatocytes in vitro. Evidence of a mitogen restriction point in mid-late G1." *J Biol Chem***271**(19): 11484-11492.
- Lu, X. J., J. Chen, C. H. Yu, Y. H. Shi, Y. Q. He, R. C. Zhang, Z. A. Huang, J. N. Lv, S. Zhang and L. Xu (2013). "LECT2 protects mice against bacterial sepsis by activating macrophages via the CD209a receptor." *J Exp Med***210**(1): 5-13.
- Lumsden, A. B., J. M. Henderson and M. H. Kutner (1988). "Endotoxin levels measured by a chromogenic assay in portal, hepatic and peripheral venous blood in patients with cirrhosis." *Hepatology***8**(2): 232-236.
- Ma, H. L., Y. H. Shi, X. H. Zhang, M. Y. Li and J. Chen (2016). "A transmembrane C-type lectin receptor mediates LECT2 effects on head kidney-derived monocytes/macrophages in a teleost, *Plecoglossus altivelis*." *Fish Shellfish Immunol***51**: 70-76.
- MacDonald, B. T., K. Tamai and X. He (2009). "Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases." *Dev Cell***17**(1): 9-26.
- Maeda, S., H. Kamata, J. L. Luo, H. Leffert and M. Karin (2005). "IKKbeta couples hepatocyte death to cytokine-driven compensatory proliferation that promotes chemical hepatocarcinogenesis." *Cell***121**(7): 977-990.
- Marchesini, G., E. Bugianesi, G. Forlani, F. Cerrelli, M. Lenzi, R. Manini, S. Natale, E. Vanni, N. Villanova, N. Melchionda and M. Rizzetto (2003). "Nonalcoholic fatty liver, steatohepatitis, and the metabolic syndrome." *Hepatology***37**(4): 917-923.

- Margall-Ducos, G., S. Celton-Morizur, D. Couton, O. Bregerie and C. Desdouets (2007). "Liver tetraploidization is controlled by a new process of incomplete cytokinesis." J Cell Sci**120**(Pt 20): 3633-3639.
- Mari, M., F. Caballero, A. Colell, A. Morales, J. Caballeria, A. Fernandez, C. Enrich, J. C. Fernandez-Checa and C. Garcia-Ruiz (2006). "Mitochondrial free cholesterol loading sensitizes to TNF- and Fas-mediated steatohepatitis." Cell Metab**4**(3): 185-198.
- Martinez-Botas, J., Y. Suarez, A. J. Ferruelo, D. Gomez-Coronado and M. A. Lasuncion (1999). "Cholesterol starvation decreases p34(cdc2) kinase activity and arrests the cell cycle at G2." FASEB J**13**(11): 1359-1370.
- Mashek, D. G., S. A. Khan, A. Sathyanarayan, J. M. Ploeger and M. P. Franklin (2015). "Hepatic lipid droplet biology: Getting to the root of fatty liver." Hepatology**62**(3): 964-967.
- Mathews, S. T., G. P. Singh, M. Ranalletta, V. J. Cintron, X. Qiang, A. S. Goustin, K. L. Jen, M. J. Charron, W. Jahnen-Dechent and G. Grunberger (2002). "Improved insulin sensitivity and resistance to weight gain in mice null for the Ahsg gene." Diabetes**51**(8): 2450-2458.
- McGarry, J. D. and D. W. Foster (1980). "Regulation of hepatic fatty acid oxidation and ketone body production." Annu Rev Biochem**49**: 395-420.
- Meng, F., K. Wang, T. Aoyama, S. I. Grivennikov, Y. Paik, D. Scholten, M. Cong, K. Iwaisako, X. Liu, M. Zhang, C. H. Osterreicher, F. Stickel, K. Ley, D. A. Brenner and T. Kisseleva (2012). "Interleukin-17 signaling in inflammatory, Kupffer cells, and hepatic stellate cells exacerbates liver fibrosis in mice." Gastroenterology**143**(3): 765-776 e761-763.
- Michalopoulos, G. K. (2007). "Liver regeneration." J Cell Physiol**213**(2): 286-300.
- Michalopoulos, G. K. and M. C. DeFrances (1997). "Liver regeneration." Science**276**(5309): 60-66.
- Michelotti, G. A., M. V. Machado and A. M. Diehl (2013). "NAFLD, NASH and liver cancer." Nat Rev Gastroenterol Hepatol**10**(11): 656-665.
- Min, H. K., A. Kapoor, M. Fuchs, F. Mirshahi, H. Zhou, J. Maher, J. Kellum, R. Warnick, M. J. Contos and A. J. Sanyal (2012). "Increased hepatic synthesis and dysregulation of cholesterol metabolism is associated with the severity of nonalcoholic fatty liver disease." Cell Metab**15**(5): 665-674.
- Mitchell, C., M. A. Robin, A. Mayeuf, M. Mahrouf-Yorgov, A. Mansouri, M. Hamard, D. Couton, B. Fromenty and H. Gilgenkrantz (2009). "Protection against hepatocyte mitochondrial dysfunction delays fibrosis progression in mice." Am J Pathol**175**(5): 1929-1937.
- Mitchell, C. and H. Willenbring (2008). "A reproducible and well-tolerated method for 2/3 partial hepatectomy in mice." Nat Protoc**3**(7): 1167-1170.
- Miura, K., L. Yang, N. van Rooijen, H. Ohnishi and E. Seki (2012). "Hepatic recruitment of macrophages promotes nonalcoholic steatohepatitis through CCR2." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**302**(11): G1310-1321.
- Moschen, A. R., S. Kaser and H. Tilg (2013). "Non-alcoholic steatohepatitis: a microbiota-driven disease." Trends Endocrinol Metab**24**(11): 537-545.
- Musso, G., R. Gambino and M. Cassader (2013). "Cholesterol metabolism and the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis." Prog Lipid Res**52**(1): 175-191.
- Nagai, H., T. Hamada, T. Uchida, S. Yamagoe and K. Suzuki (1998). "Systemic expression of a newly recognized protein, LECT2, in the human body." Pathol Int**48**(11): 882-886.
- Nakagawa, H., A. Umemura, K. Taniguchi, J. Font-Burgada, D. Dhar, H. Ogata, Z. Zhong, M. A. Valasek, E. Seki, J. Hidalgo, K. Koike, R. J. Kaufman and M. Karin (2014). "ER stress cooperates with hypernutrition to trigger TNF-dependent spontaneous HCC development." Cancer Cell**26**(3): 331-343.

- Nault, J. C. and J. Zucman-Rossi (2014). "Genetics of hepatocellular carcinoma: the next generation." *J Hepatol***60**(1): 224-226.
- 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.
- Okumura, A., T. Saito, I. Otani, K. Kojima, Y. Yamada, A. Ishida-Okawara, K. Nakazato, M. Asano, K. Kanayama, Y. Iwakura, K. Suzuki and S. Yamagoe (2008). "Suppressive role of leukocyte cell-derived chemotaxin 2 in mouse anti-type II collagen antibody-induced arthritis." *Arthritis Rheum***58**(2): 413-421.
- Okumura, A., T. Suzuki, H. Miyatake, T. Okabe, Y. Hashimoto, T. Miyakawa, H. Zheng, H. Unoki-Kubota, H. Ohno, N. Dohmae, Y. Kaburagi, Y. Miyazaki, M. Tanokura and S. Yamagoe (2013). "Leukocyte cell-derived chemotaxin 2 is a zinc-binding protein." *FEBS Lett***587**(5): 404-409.
- Otto, S. P. and J. Whitton (2000). "Polyploid incidence and evolution." *Annu Rev Genet***34**: 401-437.
- Ovejero, C., C. Cavard, A. Perianin, T. Hakvoort, J. Vermeulen, C. Godard, M. Fabre, P. Chafey, K. Suzuki, B. Romagnolo, S. Yamagoe and C. Perret (2004). "Identification of the leukocyte cell-derived chemotaxin 2 as a direct target gene of beta-catenin in the liver." *Hepatology***40**(1): 167-176.
- Pal, D., S. Dasgupta, R. Kundu, S. Maitra, G. Das, S. Mukhopadhyay, S. Ray, S. S. Majumdar and S. Bhattacharya (2012). "Fetuin-A acts as an endogenous ligand of TLR4 to promote lipid-induced insulin resistance." *Nat Med***18**(8): 1279-1285.
- Paradis, V., S. Zalinski, E. Chelbi, N. Guedj, F. Degos, V. Vilgrain, P. Bedossa and J. Belghiti (2009). "Hepatocellular carcinomas in patients with metabolic syndrome often develop without significant liver fibrosis: a pathological analysis." *Hepatology***49**(3): 851-859.
- Park, E. J., J. H. Lee, G. Y. Yu, G. He, S. R. Ali, R. G. Holzer, C. H. Osterreicher, H. Takahashi and M. Karin (2010). "Dietary and genetic obesity promote liver inflammation and tumorigenesis by enhancing IL-6 and TNF expression." *Cell***140**(2): 197-208.
- Pessayre, D. and B. Fromenty (2005). "NASH: a mitochondrial disease." *J Hepatol***42**(6): 928-940.
- Postic, C. and J. Girard (2008). "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.
- Powell, E. E., W. G. Cooksley, R. Hanson, J. Searle, J. W. Halliday and L. W. Powell (1990). "The natural history of nonalcoholic steatohepatitis: a follow-up study of forty-two patients for up to 21 years." *Hepatology***11**(1): 74-80.
- Puri, P., R. A. Baillie, M. M. Wiest, F. Mirshahi, J. Choudhury, O. Cheung, C. Sargeant, M. J. Contos and A. J. Sanyal (2007). "A lipidomic analysis of nonalcoholic fatty liver disease." *Hepatology***46**(4): 1081-1090.
- Racanelli, V. and B. Rehermann (2006). "The liver as an immunological organ." *Hepatology***43**(2 Suppl 1): S54-62.
- Rappaport, A. M., Z. J. Borowy, W. M. Loughed and W. N. Lotto (1954). "Subdivision of hexagonal liver lobules into a structural and functional unit; role in hepatic physiology and pathology." *Anat Rec***119**(1): 11-33.
- Repa, J. J., G. Liang, J. Ou, Y. Bashmakov, J. M. Lobaccaro, I. Shimomura, B. Shan, M. S. Brown, J. L. Goldstein and D. J. Mangelsdorf (2000). "Regulation of mouse sterol regulatory element-binding protein-1c gene (SREBP-1c) by oxysterol receptors, LXRalpha and LXRbeta." *Genes Dev***14**(22): 2819-2830.
- Ribeiro, P. S., H. Cortez-Pinto, S. Sola, R. E. Castro, R. M. Ramalho, A. Baptista, M. C. Moura, M. E. Camilo and C. M. Rodrigues (2004). "Hepatocyte apoptosis, expression of

- death receptors, and activation of NF-kappaB in the liver of nonalcoholic and alcoholic steatohepatitis patients." Am J Gastroenterol**99**(9): 1708-1717.
- Saito, T., A. Okumura, H. Watanabe, M. Asano, A. Ishida-Okawara, J. Sakagami, K. Sudo, Y. Hatano-Yokoe, J. S. Bezbradica, S. Joyce, T. Abo, Y. Iwakura, K. Suzuki and S. Yamagoe (2004). "Increase in hepatic NKT cells in leukocyte cell-derived chemotaxin 2-deficient mice contributes to severe concanavalin A-induced hepatitis." J Immunol**173**(1): 579-585.
- Sanyal, A. J., C. Campbell-Sargent, F. Mirshahi, W. B. Rizzo, M. J. Contos, R. K. Sterling, V. A. Luketic, M. L. Shiffman and J. N. Clore (2001). "Nonalcoholic steatohepatitis: association of insulin resistance and mitochondrial abnormalities." Gastroenterology**120**(5): 1183-1192.
- Savard, C., E. V. Tartaglione, R. Kuver, W. G. Haigh, G. C. Farrell, S. Subramanian, A. Chait, M. M. Yeh, L. S. Quinn and G. N. Ioannou (2013). "Synergistic interaction of dietary cholesterol and dietary fat in inducing experimental steatohepatitis." Hepatology**57**(1): 81-92.
- Schreiber, R. D., L. J. Old and M. J. Smyth (2011). "Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion." Science**331**(6024): 1565-1570.
- Schroder, K., R. Zhou and J. Tschopp (2010). "The NLRP3 inflammasome: a sensor for metabolic danger?" Science**327**(5963): 296-300.
- Schwabe, R. F. and C. Jobin (2013). "The microbiome and cancer." Nat Rev Cancer**13**(11): 800-812.
- Seglen, P. O. (1997). "DNA ploidy and autophagic protein degradation as determinants of hepatocellular growth and survival." Cell Biology and Toxicology**13**: 301-315.
- Seki, E. and R. F. Schwabe (2015). "Hepatic inflammation and fibrosis: functional links and key pathways." Hepatology**61**(3): 1066-1079.
- Seki, S., T. Kitada and H. Sakaguchi (2005). "Clinicopathological significance of oxidative cellular damage in non-alcoholic fatty liver diseases." Hepatol Res**33**(2): 132-134.
- Shiojiri, N., J. M. Lemire and N. Fausto (1991). "Cell lineages and oval cell progenitors in rat liver development." Cancer Res**51**(10): 2611-2620.
- Siegel, A. B. and A. X. Zhu (2009). "Metabolic syndrome and hepatocellular carcinoma: two growing epidemics with a potential link." Cancer**115**(24): 5651-5661.
- Sigal, S. H., P. Rajvanshi, G. R. Gorla, R. P. Sokhi, R. Saxena, D. R. Gebhard, Jr., L. M. Reid and S. Gupta (1999). "Partial hepatectomy-induced polyploidy attenuates hepatocyte replication and activates cell aging events." Am J Physiol**276**(5 Pt 1): G1260-1272.
- Smedsrod, B., P. J. De Bleser, F. Braet, P. Lovisetti, K. Vanderkerken, E. Wisse and A. Geerts (1994). "Cell biology of liver endothelial and Kupffer cells." Gut**35**(11): 1509-1516.
- Starley, B. Q., C. J. Calcagno and S. A. Harrison (2010). "Nonalcoholic fatty liver disease and hepatocellular carcinoma: a weighty connection." Hepatology**51**(5): 1820-1832.
- Stefan, N. and H. U. Haring (2013). "The role of hepatokines in metabolism." Nat Rev Endocrinol**9**(3): 144-152.
- Stocker, E. and W. D. Heine (1971). "Regeneration of liver parenchyma under normal and pathological conditions." Beitr Pathol**144**(4): 400-408.
- Sunny, N. E., E. J. Parks, J. D. Browning and S. C. Burgess (2011). "Excessive hepatic mitochondrial TCA cycle and gluconeogenesis in humans with nonalcoholic fatty liver disease." Cell Metab**14**(6): 804-810.
- Sutti, S., A. Jindal, I. Locatelli, M. Vacchiano, L. Gigliotti, C. Bozzola and E. Albano (2014). "Adaptive immune responses triggered by oxidative stress contribute to hepatic inflammation in NASH." Hepatology**59**(3): 886-897.
- Syn, W. K., Y. H. Oo, T. A. Pereira, G. F. Karaca, Y. Jung, A. Omenetti, R. P. Witek, S. S. Choi, C. D. Guy, C. M. Fearing, V. Teaberry, F. E. Pereira, D. H. Adams and A. M.

- Diehl (2010). "Accumulation of natural killer T cells in progressive nonalcoholic fatty liver disease." *Hepatology***51**(6): 1998-2007.
- Tabas, I. (2002). "Consequences of cellular cholesterol accumulation: basic concepts and physiological implications." *J Clin Invest***110**(7): 905-911.
- Tak, P. P. and G. S. Firestein (2001). "NF-kappaB: a key role in inflammatory diseases." *J Clin Invest***107**(1): 7-11.
- Takahashi, Y., Y. Soejima and T. Fukusato (2012). "Animal models of nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis." *World J Gastroenterol***18**(19): 2300-2308.
- Tall, A. R. and L. Yvan-Charvet (2015). "Cholesterol, inflammation and innate immunity." *Nat Rev Immunol***15**(2): 104-116.
- Tang, Y., Z. Bian, L. Zhao, Y. Liu, S. Liang, Q. Wang, X. Han, Y. Peng, X. Chen, L. Shen, D. Qiu, Z. Li and X. Ma (2011). "Interleukin-17 exacerbates hepatic steatosis and inflammation in non-alcoholic fatty liver disease." *Clin Exp Immunol***166**(2): 281-290.
- Tanoli, T., P. Yue, D. Yablonskiy and G. Schonfeld (2004). "Fatty liver in familial hypobetalipoproteinemia: roles of the APOB defects, intra-abdominal adipose tissue, and insulin sensitivity." *J Lipid Res***45**(5): 941-947.
- Taub, R. (2004). "Liver regeneration: from myth to mechanism." *Nat Rev Mol Cell Biol***5**(10): 836-847.
- Terabe, M., J. Swann, E. Ambrosino, P. Sinha, S. Takaku, Y. Hayakawa, D. I. Godfrey, S. Ostrand-Rosenberg, M. J. Smyth and J. A. Berzofsky (2005). "A nonclassical non-Valpha14Jalpha18 CD1d-restricted (type II) NKT cell is sufficient for down-regulation of tumor immunosurveillance." *J Exp Med***202**(12): 1627-1633.
- Thiam, A. R., R. V. Farese, Jr. and T. C. Walther (2013). "The biophysics and cell biology of lipid droplets." *Nat Rev Mol Cell Biol***14**(12): 775-786.
- Thompson, M. D. and S. P. Monga (2007). "WNT/beta-catenin signaling in liver health and disease." *Hepatology***45**(5): 1298-1305.
- Thomson, A. W. and P. A. Knolle (2010). "Antigen-presenting cell function in the tolerogenic liver environment." *Nat Rev Immunol***10**(11): 753-766.
- Tilg, H. (2010). "Adipocytokines in nonalcoholic fatty liver disease: key players regulating steatosis, inflammation and fibrosis." *Curr Pharm Des***16**(17): 1893-1895.
- Tilg, H. and A. R. Moschen (2010). "Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: the multiple parallel hits hypothesis." *Hepatology***52**(5): 1836-1846.
- Tiwari, S. and S. A. Siddiqi (2012). "Intracellular trafficking and secretion of VLDL." *Arterioscler Thromb Vasc Biol***32**(5): 1079-1086.
- Tomita, K., G. Tamiya, S. Ando, K. Ohsumi, T. Chiyo, A. Mizutani, N. Kitamura, K. Toda, T. Kaneko, Y. Horie, J. Y. Han, S. Kato, M. Shimoda, Y. Oike, M. Tomizawa, S. Makino, T. Ohkura, H. Saito, N. Kumagai, H. Nagata, H. Ishii and T. Hibi (2006). "Tumour necrosis factor alpha signalling through activation of Kupffer cells plays an essential role in liver fibrosis of non-alcoholic steatohepatitis in mice." *Gut***55**(3): 415-424.
- Tschopp, J. and K. Schroder (2010). "NLRP3 inflammasome activation: The convergence of multiple signalling pathways on ROS production?" *Nat Rev Immunol***10**(3): 210-215.
- Van Rooyen, D. M., C. Z. Larter, W. G. Haigh, M. M. Yeh, G. Ioannou, R. Kuver, S. P. Lee, N. C. Teoh and G. C. Farrell (2011). "Hepatic free cholesterol accumulates in obese, diabetic mice and causes nonalcoholic steatohepatitis." *Gastroenterology***141**(4): 1393-1403, 1403 e1391-1395.
- Vijay-Kumar, M., J. D. Aitken, F. A. Carvalho, T. C. Cullender, S. Mwangi, S. Srinivasan, S. V. Sitaraman, R. Knight, R. E. Ley and A. T. Gewirtz (2010). "Metabolic syndrome and altered gut microbiota in mice lacking Toll-like receptor 5." *Science***328**(5975): 228-231.
- Violante, S., L. Ijlst, H. Te Brinke, I. Tavares de Almeida, R. J. Wanders, F. V. Ventura and S. M. Houten (2013). "Carnitine palmitoyltransferase 2 and carnitine/acylcarnitine

- translocase are involved in the mitochondrial synthesis and export of acylcarnitines." *FASEB J***27**(5): 2039-2044.
- Wang, J., I. Leclercq, J. M. Brymora, N. Xu, M. Ramezani-Moghadam, R. M. London, D. Brigstock and J. George (2009). "Kupffer cells mediate leptin-induced liver fibrosis." *Gastroenterology***137**(2): 713-723.
- Wehr, A., C. Baeck, F. Heymann, P. M. Niemietz, L. Hammerich, C. Martin, H. W. Zimmermann, O. Pack, N. Gassler, K. Hittatiya, A. Ludwig, T. Luedde, C. Trautwein and F. Tacke (2013). "Chemokine receptor CXCR6-dependent hepatic NK T Cell accumulation promotes inflammation and liver fibrosis." *J Immunol***190**(10): 5226-5236.
- Weibel, E. R., W. Staubli, H. R. Gnagi and F. A. Hess (1969). "Correlated morphometric and biochemical studies on the liver cell. I. Morphometric model, stereologic methods, and normal morphometric data for rat liver." *J Cell Biol***42**(1): 68-91.
- Wolf, M. J., A. Adili, K. Piotrowitz, Z. Abdullah, Y. Boege, K. Stemmer, M. Ringelhan, N. Simonavicius, M. Egger, D. Wohlleber, A. Lorentzen, C. Einer, S. Schulz, T. Clavel, U. Protzer, C. Thiele, H. Zischka, H. Moch, M. Tschop, A. V. Tumanov, D. Haller, K. Unger, M. Karin, M. Kopf, P. Knolle, A. Weber and M. Heikenwalder (2014). "Metabolic activation of intrahepatic CD8+ T cells and NKT cells causes nonalcoholic steatohepatitis and liver cancer via cross-talk with hepatocytes." *Cancer Cell***26**(4): 549-564.
- Wouters, K., M. van Bilsen, P. J. van Gorp, V. Bieghs, D. Lutjohann, A. Kerksiek, B. Staels, M. H. Hofker and R. Shiri-Sverdlov (2010). "Intrahepatic cholesterol influences progression, inhibition and reversal of non-alcoholic steatohepatitis in hyperlipidemic mice." *FEBS Lett***584**(5): 1001-1005.
- Wree, A., A. Eguchi, M. D. McGeough, C. A. Pena, C. D. Johnson, A. Canbay, H. M. Hoffman and A. E. Feldstein (2014). "NLRP3 inflammasome activation results in hepatocyte pyroptosis, liver inflammation, and fibrosis in mice." *Hepatology***59**(3): 898-910.
- Wree, A., M. D. McGeough, C. A. Pena, M. Schlattjan, H. Li, M. E. Inzaugarat, K. Messer, A. Canbay, H. M. Hoffman and A. E. Feldstein (2014). "NLRP3 inflammasome activation is required for fibrosis development in NAFLD." *J Mol Med (Berl)***92**(10): 1069-1082.
- Xu, R., H. Huang, Z. Zhang and F. S. Wang (2014). "The role of neutrophils in the development of liver diseases." *Cell Mol Immunol***11**(3): 224-231.
- Yamagoe, S., S. Mizuno and K. Suzuki (1998). "Molecular cloning of human and bovine LECT2 having a neutrophil chemotactic activity and its specific expression in the liver." *Biochim Biophys Acta***1396**(1): 105-113.
- Yamagoe, S., T. Watanabe, S. Mizuno and K. Suzuki (1998). "The mouse Lect2 gene: cloning of cDNA and genomic DNA, structural characterization and chromosomal localization." *Gene***216**(1): 171-178.
- Yamagoe, S., Y. Yamakawa, Y. Matsuo, J. Minowada, S. Mizuno and K. Suzuki (1996). "Purification and primary amino acid sequence of a novel neutrophil chemotactic factor LECT2." *Immunol Lett***52**(1): 9-13.
- Yamaguchi, K., L. Yang, S. McCall, J. Huang, X. X. Yu, S. K. Pandey, S. Bhanot, B. P. Monia, Y. X. Li and A. M. Diehl (2007). "Inhibiting triglyceride synthesis improves hepatic steatosis but exacerbates liver damage and fibrosis in obese mice with nonalcoholic steatohepatitis." *Hepatology***45**(6): 1366-1374.
- Yanger, K., D. Knigin, Y. Zong, L. Maggs, G. Gu, H. Akiyama, E. Pikarsky and B. Z. Stanger (2014). "Adult hepatocytes are generated by self-duplication rather than stem cell differentiation." *Cell Stem Cell***15**(3): 340-349.
- Yu, J., J. Shen, T. T. Sun, X. Zhang and N. Wong (2013). "Obesity, insulin resistance, NASH and hepatocellular carcinoma." *Semin Cancer Biol***23**(6 Pt B): 483-491.

